

Caracterización y cuantificación de las poblaciones de bacterias y arqueas presentes en digestores anaerobios de EDAR

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Máster Interuniversitario en Ingeniería Ambiental

Alumno: Esmeralda A. Segovia Fernández

Tutores universidad: Daniel Aguado García y Luis Borrás Falomir

Tutor empresa: Ángela Baeza Serrano

Valencia, Septiembre de 2018

RESUMEN

Los digestores anaerobios se han convertido en foco de atención en los últimos años. Estos son unidades de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) en las que un grupo complejo de microorganismos se encargan de descomponer la materia orgánica compleja en ausencia de oxígeno dando lugar a un biocombustible conocido como biogás, el cual es una fuente de energía renovable que se puede utilizar en el propio proceso, por ejemplo, en el calentamiento del digestor o para abastecer parte del consumo energético de la planta.

Así pues, en los últimos años, para mejorar el rendimiento de producción de biogás en los digestores se han empezado a utilizar los residuos de otros procesos industriales. Básicamente estos procesos, conocidos como codigestión anaerobia, consisten en el tratamiento conjunto de los fangos producidos en la línea de aguas más residuos orgánicos diferentes para conseguir una óptima recuperación de la energía. La complejidad de su aplicación a escala real hace necesario el estudio del uso de diferentes tipos de cosustratos, donde la viabilidad de la aplicación de cada tipo de sustrato depende de sus propiedades fisicoquímicas y su contenido en nutrientes, dado que se trata de un proceso microbiológico.

En estos sistemas, conocer la microbiología que se desarrolla es de crucial importancia para obtener buenos rendimientos de biogás en el digestor anaerobio. Por esto surge este trabajo, el cual ha permitido conocer de forma global algunas poblaciones microbianas y las diferencias que existen en cuanto a presencia y abundancia de las poblaciones microbianas involucradas en los procesos de digestión y codigestión anaerobios llevados a cabo en diferentes EDAR de la provincia de Valencia: Quart-Benàger, Gandía y Ontinyent, y se ha evaluado su relación con los parámetros operacionales. Todos operan en condiciones mesofílicas, pero a diferentes tiempos de retención celular y los dos primeros son alimentados con cosustratos de composiciones diferentes. Este trabajo se enmarca en un convenio con la Cátedra de Aguas de Valencia, lo que ha facilitado la adquisición de las muestras.

La identificación de las poblaciones microbianas se ha llevado a cabo empleando la técnica molecular FISH (Fluorescent *in situ* hybridization). Esta técnica reveló la presencia de bacterias de los phylum *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* y de la clase *Betaproteobacteria*, así como de bacterias sulfatoreductoras (SRB) con diferentes abundancias en los tres digestores. En cuanto a la presencia de arqueas metanogénicas, se identificó el orden *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*, aunque éstos dos últimos solo se detectaron en dos de los tres digestores y presentaban una abundancia menor a un 1% respecto del total de arqueas y bacterias. De las metanogénicas detectadas, el orden *Methanosarcinales* fue el predominante en todas las muestras de los tres digestores, siendo el género *Methanosaeta* el único detectado. Esta técnica no reveló la presencia del orden *Methanococcales*. La comunidad microbiológica presentó más variabilidad entre las muestras en el digestor de Quart-Benàger en comparación con los otros dos, digestor en el que se añade más cantidad y variedad de cosustratos. En los otros dos digestores se observó que la población no variaba estadísticamente entre las muestras.

Posteriormente se estudió la posible influencia de los parámetros de operación y de las variables fisicoquímicas del proceso sobre la población microbiológica. La abundancia detectada para los phylum *Actinobacteria* y *Chloroflexi* en el digestor de QB parece verse afectada por las variaciones del tiempo de retención celular (TRC) y de la temperatura, ya que un TRC más elevado supone una mayor estabilización del fango y, por lo tanto, una menor concentración de bacterias. Además, esto coincide con una disminución de la concentración de ácidos grasos volátiles en el digestor. En los digestores de Gandía y Ontinyent no se ha observado ninguna

relación con los parámetros debido a la poca variabilidad de éstos y de la comunidad microbiológica.

En cuanto a los cosustratos añadidos, no se ha visto ningún efecto claro sobre la población microbiológica detectada ni en el rendimiento en cuanto a porcentaje de metano en el biogás en cada digestor. Esto tiene sentido ya que no se conoce qué fracción de esa DQO está disponible para los microorganismos. Probablemente, las cargas orgánicas debidas a los cosustratos sean muy bajas y éstas tengan que superar un cierto umbral para notar un efecto en el rendimiento del digestor.

Una comparación de la producción de biogás entre los tres digestores ha puesto de manifiesto como el mayor rendimiento del digestor de QB parece estar relacionado con la utilización de tiempos de retención celular (TRC), temperaturas (T) y cargas orgánicas debida al cosustrato mayores, condiciones que favorecen el desarrollo de las metanogénicas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le doy las gracias a mi familia. Ellos fueron los que desde el primer momento me apoyaron y animaron en mi decisión de trasladarme a otra ciudad a emprender una nueva aventura. Aunque no fue nada fácil, ellos me motivaron a continuar. Hoy, sé que ha sido una de las mejores decisiones que he tomado en mi vida.

A ti, mi amor, por la gran declaración de amor que hiciste al dejar todo en nuestra ciudad y venirte a Valencia a vivir esta aventura conmigo. Sin duda, nada habría sido igual sin ti a mi lado. Gracias infinitas por aguantarme en los momentos difíciles y por la paciencia que has tenido. Todo es más fácil contigo.

Agradecer a la Cátedra de Aguas de Valencia la gran oportunidad que me ofrecieron. Para mí ha sido todo un orgullo poder formar parte de uno de sus proyectos. Espero haber estado a la altura.

Por supuesto a mis tutores, Daniel Aguado, Luis Borrás y Ángela Baeza, porque han estado ahí siempre que los he necesitado. En especial, Luis te agradezco toda la dedicación que has demostrado con este trabajo y, sobre todo, la paciencia, no habría podido tener más suerte.

Por último, a todos los compañeros del máster que me han animado y ayudado en los momentos más difíciles. En especial, Patri por ser mi compañera de locuras, penas y alegrías durante la estancia en el laboratorio.

ÍNDICE

1. Introducción	7
1.1. Digestión anaerobia	8
1.2. Microorganismos involucrados en el proceso anaerobio	10
1.2.1. Arqueas metanogénicas	10
1.2.2. Bacterias hidrolíticas, acidogénicas y acetogénicas	14
1.2.3. Bacterias Sulfatoredutoras (SRB).....	17
1.3. Influencia de distintos parámetros sobre el proceso anaerobio	20
1.4. Técnicas moleculares para la caracterización de comunidades microbianas.....	23
1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
1.4.2. Hibridación fluorescente in situ (FISH).....	26
1.4.3. Microarrays	27
1.4.4. NGS (Next Generation Sequencing)	28
1.5. Proceso de codigestión	29
2. Objetivos	34
3. Materiales y métodos	35
3.1. Toma de muestras.....	35
3.2. Parámetros fisicoquímicos y operacionales de los digestores.....	38
3.3. Hibridación fluorescente in situ (FISH).....	40
3.3.1. Reactivos	40
3.3.2. Equipos y materiales necesarios	42
3.3.3. Protocolo de FISH	42
3.3.4. Tratamiento de muestras con lisozima	45
3.4. Sondas	45
3.5. Observación y cuantificación	48
3.6. Análisis estadístico	49
4. Resultados	53
4.1. Cuantificación.....	53
4.2. Comparación de la microbiología en función de los parámetros operacionales y fisicoquímicos.....	63
4.3. Comparación de los rendimientos entre los digestores	69
4.4. Relación de los resultados microbiológicos obtenidos con los parámetros fisicoquímicos y operacionales.....	86
5. Conclusiones.....	103
REFERENCIAS.....	105

ANEXO 115

1. Introducción

En las últimas décadas, la demanda energética del ser humano ha aumentado de forma exponencial. Hasta el día de hoy, estas necesidades se han cubierto con fuentes de energía fósiles. Sin embargo, los inconvenientes que presentan este tipo de combustibles, como su elevado poder contaminante, su inevitable agotamiento y su baja sostenibilidad económica, llevan a la búsqueda y al estudio de otras posibilidades. Es aquí donde entran en juego las energías renovables y los biocombustibles.

Por otra parte, este uso desenfrenado de los recursos naturales, y la forma de vida actual, da lugar a una gran cantidad de residuos, tanto urbanos como industriales, cada vez más complejos y más difíciles de tratar. Es por esto por lo que la depuración de aguas se ha puesto de relieve para permitir la reutilización de los recursos hídricos y un desarrollo sostenible.

En una típica estación depuradora de aguas residuales (EDAR), una importante cantidad de fango se recoge de la sedimentación primaria y del proceso de fangos activados y deben ser tratados antes de su eliminación para la protección del medio ambiente. Además, el tratamiento de estos fangos puede suponer hasta el 60% del coste total asociado con el tratamiento de aguas residuales municipales (Ramakrishna *et al.*, 2005). En relación con esto, se han realizado numerosas investigaciones dedicadas a minimizar la generación de lodos (Semblante *et al.*, 2014) y optimizar el tratamiento del fango (Brisolara *et al.*, 2011). Entre las opciones actualmente disponibles para el tratamiento de lodos de aguas residuales, la digestión anaerobia es probablemente la tecnología más ampliamente utilizada.

Con el fin de optimizar los procesos de digestión anaerobia presentes en la línea de fangos de las EDAR unido a la creciente preocupación por la eliminación de las grandes cantidades de desechos orgánicos procedentes de fuentes domésticas, industriales y agrícolas se han desarrollado nuevas tecnologías de digestión anaerobia que responden a procesos de codigestión anaerobia. En este proceso el fango generado en la línea de aguas, el cual presenta una baja concentración de materia orgánica y de sólidos volátiles, lo que hace que generalmente el digestor opere a bajas cargas orgánicas, es codigerido con otros sustratos biodegradables que compensan las carencias que cada sustrato tiene por separado para aumentar la producción de biogás.

En este proceso intervienen diferentes grupos de microorganismos que actúan de forma sintrófica. El desequilibrio entre los diferentes grupos microbianos puede conducir no sólo a una disminución en la producción de metano sino también al fallo del proceso por la acumulación de productos intermedios que pueden inhibir a los microorganismos. Existe mucha información sobre la estructura de la comunidad biológica en digestores anaerobios a escala piloto. Gracias a la generalización de las técnicas de biología molecular, se han ensayado varias técnicas cualitativas, como DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), y cuantitativas, como qPCR (*Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*) o FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), para el estudio de la dinámica de las poblaciones microbianas en relación con los diversos parámetros de operación y control empleados para describir el comportamiento a nivel macroscópico de los biorreactores. Consecuentemente, la caracterización microbiológica está cambiando la visión paradigmática del biorreactor como una “caja negra” y permite establecer un diagnóstico preciso de los procesos implicados a escala microbiana. Sin embargo, se ha encontrado muy poca información sobre la composición de las comunidades microbianas en digestores anaerobios a escala real, sometidos a fluctuaciones derivadas de cambios de la carga orgánica, de las condiciones climáticas o de la composición del agua residual.

La microscopia tradicional nos aporta información tanto cualitativa como cuantitativa de una importante diversidad de componentes del fango activo que en el digestor están en proceso de degradación. La aplicación de nuevas técnicas microscópicas semicuantitativas, como las de viabilidad celular, nos permiten observar la abundancia de células viables y células muertas, pero no permiten la identificación de los microorganismos a nivel de especie, ni su discriminación en categorías taxonómicas superiores (por ejemplo, eubacterias versus arqueobacterias). Para una caracterización más detallada de las poblaciones microbianas se puede utilizar la técnica FISH, aunque es precisa la realización de estudios previos de la microbiología para la obtención de sondas específicas. Esta dificultad podría ser superada con la aplicación de la DGGE, que, aunque es una técnica no cuantitativa permite obtener una visión bastante precisa de las especies predominantes, así como su posterior identificación mediante la secuenciación del ADN. Sin embargo, es una técnica muy costosa, tanto en tiempo como en dinero.

1.1. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico de degradación de la materia orgánica compleja en ausencia de oxígeno para dar metano, el cual es una fuente de energía que puede aprovecharse en el mismo proceso, y dióxido de carbono.

La historia de este proceso tiene su origen en la naturaleza, sin embargo, no fue hasta el siglo XVIII cuando Volta estudió el gas combustible que se formaba en pantanos y aguas residuales. En 1804, Dalton estableció la fórmula química y la asoció con el gas metano, y en 1868 Beauchamp determinó la participación de microorganismos unicelulares en el proceso. En 1875 Propoff descubrió que sólo se formaba biogás en condiciones anaerobias, y finalmente, en 1884, Pasteur analizó la intervención de la temperatura en el proceso de digestión a partir de residuos de origen animal, proponiendo el uso del biogás para iluminar las calles.

La digestión anaerobia en la historia de los países industrializados se ha centrado en la gestión de residuos y a partir de la crisis energética de los años setenta, la biometanización se planteó como una forma plausible de obtención de energía. Fue Dinamarca en 1985 donde comenzó un programa de desarrollo para potenciar las plantas de digestión anaerobia como productores de energía eléctrica.

El biogás producido en la digestión anaerobia tiene un alto contenido en metano, con un elevado poder calorífico, del orden de 5250 kcal/m^3 . Así, la energía que contiene 1 m^3 de metano equivale a la energía de $0,6 \text{ m}^3$ de gas natural (IDAE, Instituto para el Desarrollo y Ahorra de Energía, octubre 2007), de ahí el interés de la digestión anaerobia frente a otro tipo de tratamiento de residuos.

La digestión anaerobia es ampliamente usada en las EDAR para estabilizar la mezcla de fangos primarios y secundarios previamente a su aplicación sobre el terreno o su posterior tratamiento térmico, al mismo tiempo que se produce energía para contrarrestar parte de la que se consume en el proceso de tratamiento. Además, durante este proceso, nutrientes como nitrógeno y fósforo son liberados a la fase líquida en forma de amonio y fosfato, por lo que la digestión anaerobia puede ser también una excelente opción para la recuperación de nutrientes (Xie *et al.*, 2013).

Los procesos anaerobios se dan en cuatro pasos sucesivos (Figura 1):

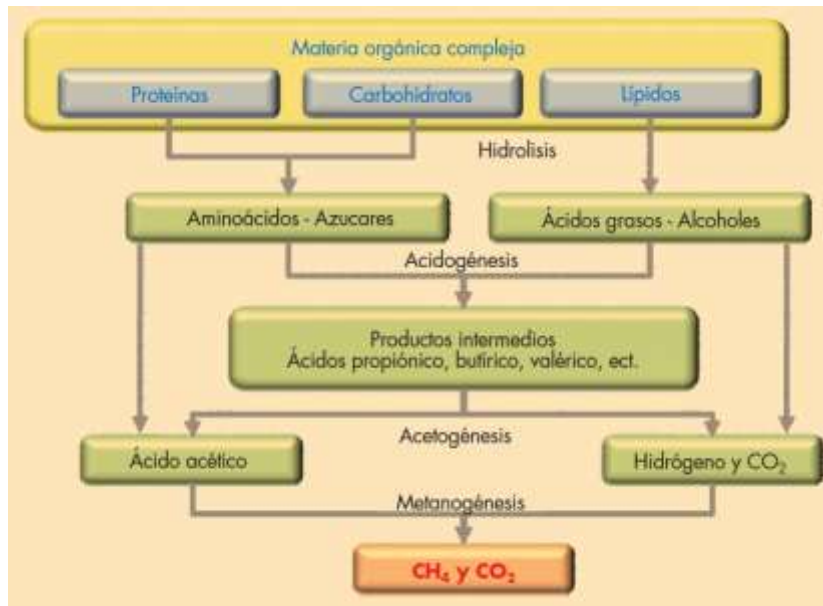


Figura 1. Etapas, sustratos y productos de la digestión anaerobia.

- **Hidrólisis:** Proceso de transformación de moléculas de gran tamaño y peso molecular en moléculas más pequeñas para facilitar su transporte a través de la membrana celular, realizado mediante la acción de enzimas extracelulares sintetizadas por los microorganismos. Tiene lugar la hidrólisis tanto de la materia particulada como de la disuelta. Este proceso es realizado por bacterias hidrolíticas (heterótrofas anaerobias) tales como *Clostridium*, *Proteus vulgaris*, *Peptococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Amani *et al.*, 2010). Este proceso es normalmente más lento que los de crecimiento biológico, por lo que suele convertirse en el limitante.
- **Acidogénesis:** Se produce la fermentación de las moléculas orgánicas solubles generadas en la hidrólisis dando lugar, por una parte, a compuestos que pueden ser utilizados directamente por las arqueas metanogénicas, como ácido acético o fórmico, o H₂, y por otra parte a compuestos que posteriormente serán oxidados por bacterias acetogénicas en la siguiente fase, como ácido propiónico, butírico o láctico. Diversos microorganismos intervienen en la degradación de azúcares, aminoácidos, y ácidos grasos de cadena larga, obteniéndose ácido acético, ácidos de cadena corta y otros compuestos.
- **Acetogénesis:** En esta fase tiene lugar la degradación por parte de microorganismos acetogénicos de algunos productos intermedios de la acidogénesis que no pueden ser utilizados directamente por los microorganismos metanogénicos, dando lugar a productos sencillos como ácido acético, H₂ y CO₂.
- **Metanogénesis:** Consiste en la conversión de los ácidos orgánicos volátiles y el hidrógeno en metano y otros productos simples por acción de microorganismos anaerobios estrictos que reciben el nombre de arqueas metanogénicas. Las especies que han sido identificadas como arqueas metanogénicas se clasifican en (Seeliger *et al.*, 2002):

- Las que convierten el acetato en metano y dióxido de carbono por la ruta acetoclástica como *Methanothrix soehngenii* y *Methanosaeta concilii*.
- Las que producen metano a partir de hidrógeno y CO₂ por la ruta hidrogenotrófica como *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* y *Methanobrevibacter arboriphilus*.
- Las especies que consumen formiato, hidrógeno y CO₂ y producen metano tales como *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter smithii*, y *Methanococcus voltae*.

1.2. Microorganismos involucrados en el proceso anaerobio

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales se encuentran una amplia variedad de microorganismos como bacterias, protozoos, algas, hongos, rotíferos y nemátodos, siendo las bacterias las que constituyen el 95% de la biomasa en el proceso de fangos activados (Seco A. y Ferrer J., 2003). En los digestores anaerobios, la mayor parte de los microorganismos que intervienen son estrictamente anaerobios, por lo que la presencia de oxígeno en el medio provoca su desaparición.

La digestión anaerobia involucra muchas especies de microorganismos simbióticos que pueden dividirse en dos amplios grupos: acidogénicas y metanogénicas. Estos dos grupos se diferencian considerablemente en su fisiología, cinéticas y requisitos de crecimiento (Yang *et al.*, 2003). Según diversos estudios, trabajar con dos digestores en serie permite optimizar las condiciones ambientales para cada uno de los dos grupos de microorganismos, disminuir costes y mejorar la eficiencia del proceso (Gough *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2003; Ke y Shi, 2005; Saddoud *et al.*, 2007).

Los microorganismos se clasifican en categorías taxonómicas, donde un grupo abarca a otros y está, a su vez, subordinado a uno mayor. Las principales unidades son las siguientes, ordenadas de mayor a menor: Dominio, reino, phylum, clase, orden, familia, género y especie. Así, la especie es la categoría más pequeña y es la base sobre la cual se construyen las demás categorías. Por su parte, el dominio, abarca a todo lo que está por debajo. Cada una de estas categorías recibe el nombre de Taxón.

1.2.1. Arqueas metanogénicas

Las arqueas metanogénicas son organismos unicelulares estrictamente anaerobios que producen metano (CH₄) como producto final de su metabolismo. Gracias a esta característica, este tipo de organismo tiene una gran importancia ecológica. Pertenecen al phylum *Euryarchaeota* del dominio *Archaea* (Ferry *et al.*, 2010). A pesar de que comparten un conjunto de características fisiológicas, son filogenéticamente muy diversas. Según Borrel *et al.* (2011), la taxonomía actual clasifica a las arqueas metanogénicas en 6 órdenes y 31 géneros todos pertenecientes al phylum *Euryarchaeota* basado en un análisis comparativo de la secuencia 16S del rRNA, así como en un número de propiedades fisiológicas como sustratos para la metanogénesis, requerimientos nutricionales, morfologías y estructuras de la envoltura celular. Entre estos 6 órdenes, *Methanocellales* fue propuesto recientemente por Sakai *et al.* (2008) como resultado del análisis de un microorganismo aislado de un arrozal (Ferry *et al.*, 2010).

Existen grandes diferencias fisiológicas y morfológicas entre ellas. Dentro de cada familia e incluso hasta en cada género, se encuentran organismos con morfología diferente, por ejemplo,

dentro de la familia Methanomicrobiaceae, hay metanógenas en forma de cocos, de espiral y de bastón. De la misma forma, dichos microorganismos, se encuentran en diferentes ambientes, y, por ende, tienen metabolismos diferentes, al reducir sustratos diferentes para obtener metano, siendo los más importantes el acetato y el hidrógeno (Van Kuijk *et al.*, 1998; Ken F. Jarrell *et al.*, 1987).

Las arqueas metanogénicas son capaces de utilizar diversos sustratos para la producción de metano (Wang *et al.*, 2000; Conrad *et al.*, 2007; Borrel *et al.*, 2011) a través de 3 rutas metabólicas diferentes:

- Hidrogenotrófica: transformación de hidrógeno, formiato o ciertos alcoholes a metano utilizando CO₂ como aceptor de electrones. La capacidad de utilizar H₂ como dador de electrones para la reducción de CO₂ es casi universal entre las arqueas metanogénicas.
- Metilotrófica: el sustrato energético lo componen una variedad de compuestos metilados como metilamina y trimetilamina, y pueden servir como sustratos para unos cuantos taxones de arqueas metanogénicas.
- Acetoclástica: transformación de acetato a metano donde el carbono metilo del acetato es reducido a metano y el carbono carboxilo es oxidado a CO₂. La capacidad de catabolizar este sustrato se limita a las especies de *Methanosarcina* (Zinder *et al.*, 1985) y *Methanosaeta* (Zinder *et al.*, 1987) del orden *Methanosarcinales*.

Según Borrel *et al.* (2011), actualmente, existe la siguiente taxonomía para los microorganismos metanogénicos:

Orden Methanobacteriales

Este orden contiene dos familias: la Familia *Methanobacteriaceae* y la Familia *Methanothermaceae*. La primera familia está formada por cuatro géneros morfológicamente distintos: *Methanobacterium* (algunas especies son termofílicas y unas pocas son alcalófilas y se encuentran en varios hábitats de agua dulce), *Methanothermobacter* (metanógenas termofílicas), *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* (organismos gram-positivos de forma esférica). La segunda familia consta de un solo género como *Methanothermus* y sus dos especies. Ambas son termófilas extremas y han sido aisladas de aguas termales. Como metanógenos hidrogenotróficos todos utilizan hidrógeno y dióxido de carbono mientras que algunos géneros de la familia *Methanobacteriaceae* son capaces de usar también formiato y/o alcoholes.

Orden Methanococcales

Consta de 2 familias, *Methanococcaceae* y *Methanocaldococcaceae* y 4 géneros de metanogenos hidrogenotróficos aislados únicamente de ambientes marinos y costeros. Todas las especies usan tanto hidrógeno como formiato como dador de electrones excepto las 3 especies de *Methanocaldococcus* que no son capaces de utilizar formiato. Presentan una gran diversidad en el rango óptimo de temperatura de crecimiento variando de 18 a 94°C. La familia *Methanococcaceae* contiene 2 géneros: *Methanococcus* que incluye 5 especies mesofílicas y *Methanothermococcus* que incluye especies termófilas. Por otro lado, la familia *Methanocaldococcaceae* está formada por dos géneros termófilos (*Methanocaldococcus* y *Methanotorris*).

Orden *Methanomicrobiales*

Comprende 3 familias y 9 géneros de metanógenos hidrogenotróficos. La familia *Methanomicrobiaceae* contiene 7 géneros con una variedad de diferentes morfotipos, la familia *Methanocorpusculaceae* con el género *Methanocorpusculum* que incluye especies mesofílicas. Por último, la familia *Methanospirillaceae* que contiene el género *Methanospirillum* también con especies mesofílicas.

Todos los organismos pertenecientes al orden *Methanomicrobiales* pueden crecer utilizando H_2 + CO_2 como sustrato, mientras que muchos de ellos también pueden utilizar formiatos y unos pocos pueden utilizar alcoholes. Por el contrario, no pueden utilizar acetato ni compuestos metilados. Pueden vivir en diversos hábitats anaerobios como sedimentos marinos (Rivard *et al.*, 1983) y de agua dulce (Blotevogel *et al.*, 1991), digestores anaerobios (Ollivier *et al.*, 1985) y tractos gastrointestinales de mamíferos (Jarvis *et al.*, 2000).

Orden *Methanosarcinales*

Está constituido por dos familias, *Methanosarcinaceae* y *Methanosaetaceae*, y 9 géneros. Sólo dos géneros de metanogénicas y que pertenecen a este orden, *Methanosaeta* y *Methanosarcina* son capaces de producir metano a partir de ácido acético por una reacción acetoclástica (Van Kuijk *et al.*, 1998). Esto es importante ya que habitualmente dos terceras partes o más del metano producido en el proceso de digestión anaerobia procede del ácido acético, lo que explica que estos géneros hayan sido encontrados como dominantes en procesos de digestión anaerobia mesofílicos (Ahring *et al.*, 1995; Patil S. *et al.*, 2011). *Methanosaeta Concilii* es una especie acetoclástica y es la única mesofílica de su género, otras especies son termófilas (Daly K. *et al.*, 2000). Por su parte, *Methanosarcina barkeri* es metabólicamente el organismo metanogénico mesofílico más versátil aislada en un cultivo puro, puesto que puede generar metano a partir de H_2 y CO_2 (hidrogenotrófica), de metanol y metilaminas (metilotrófica) y de acetato (acetoclástica) (Van Kuijk *et al.*, 1998).

Así, de los dos géneros, *Methanosaeta* son metanógenos acetoclásticos obligados que sólo crecen con acetato y poseen una mayor afinidad por éste que las especies de *Methanosarcina*, pudiendo sobrevivir con concentraciones mínimas de hasta 5-20 μM (Smith *et al.*, 2007). Además, se ha visto que *Methanosaeta* es el grupo dominante en digestores anaerobios Mesofílicos (Guo *et al.*, 2015). Como se ha visto en numerosos estudios (Schonheit *et al.*, 1982; Ahring *et al.*, 1995; Lens PNL & Kuenen 2001), en ecosistemas donde la concentración de acetato es alta, las especies de *Methanosarcina* son más abundantes que *Methanosaeta*.

Algunos estudios han sugerido que los metanógenos hidrogenotróficos son dominantes a temperaturas termofílicas y durante la inhibición debida a alta concentración de ácidos grasos volátiles y amonio (De Jonge *et al.*, 2017).

Orden *Methanopyrales*

Representa un grupo de metanógenos hipertermofílicos capaces de sobrevivir a 110 °C y que no tienen relación con el resto de metanógenos conocidos (Huber *et al.*, 2001). La única familia, *Methanopyraceae*, incluye sólo una especie, *Methanopyrus Kandleri* que es una arquea gram-positiva hidrogenotrófica capaz de crecer con H_2 y CO_2 . Han sido aislados de sedimentos marinos geotérmicos.

Orden *Methanocellales*

Estudios genómicos demuestran que estos metanógenos producen metano a partir de la reducción de CO₂ con H₂, que son capaces de metabolizar aminoácidos y azúcares simples, y que han desarrollado mecanismos de defensa para diversas especies reactivas del oxígeno, lo cual demuestra su adaptación a ambientes ricos en nutrientes y con relativa cantidad de oxígeno, características principales de sus hábitats (Conrad *et al.*, 2006). Habitan principalmente en arrozales y suelos pantanosos.

Fuera de esta clasificación, recientemente se ha propuesto un nuevo orden, lo que daría lugar a la existencia de 7 órdenes de arqueas metanogénicas. Así, el orden *Methanoplasmatales* está compuesto por especies que habitan los tractos digestivos de termitas y cucarachas, que llevan a cabo metanogénesis a partir de metanol y H₂. Por su afiliación con *Thermoplasmatales*, arqueas también pertenecientes a al phylum *Euryarchaeota*, el nombre provisional de este nuevo orden es *Methanoplasmatales* (Borrel *et al.*, 2013).

En la tabla 1 se recogen algunas características de arqueas metanogénicas típicas en digestores anaerobios hasta ahora estudiados.

Tabla 1. Características de arqueas metanogénicas típicas en digestores anaerobios (Amani *et al.*, 2010).

Substrates	Products	Typical species	Optimum growth conditions		Shape	Motility*	Gram reaction	G+C content (mol%)
			pH	Temperature, °C				
Acetate	CH ₄ , CO ₂	<i>Methanofructia seeligenii</i>	7.4–7.8	35–40	Sheathed rod	N	–	52
		<i>Methanosarcina concilia</i>	7.1–7.5	35–40	Sheathed rod	N	–	61
H ₂ , CO ₂	CH ₄	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	6.5–7.5	35–40	Coccoid	N	–	41
		<i>Methanobacterium bryantii</i>	6.9–7.2	37–39	Rod	N	+	33–38
		<i>M. thermocautotrophicum</i>	7.2–7.6	65–70 [†]	Rod	N	+	48–52
		<i>M. ulcuphilum</i>	8.1–9.1 [†]	37	Rod	N	–	57
		<i>Methanobrevibacter arborophilus</i>	7.8–8.0	30–37	Cocobacillus	N	+	28–32
		<i>Methanococcus jannaschii</i>	5.0–7.0	85 [†]	Irregular coccus	M	–	31
		<i>Methanohalobium poyneri</i>	6.6–7.2	40	Irregular rod	N	–	45
		<i>Methanospirillum hungatei</i>		30–37	Sheathed spiral	M	–	45–49
		<i>Methanoplanus endosymbiosus</i>	6.6–7.2	40	Irregular disk	N	–	39
		<i>M. olentangyi</i>		30–40				
		<i>Methanothermobacter fervidus</i>	6.5	83 [†]	Rod	M	+	33–34
		<i>Methanobacterium formicicum</i>	6.6–7.8	37–45	Rod	N	+	38–42
Formate, H ₂ , CO ₂	CH ₄ , CO ₂	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	7.0	37–39	Rod	N	+	28–31
		<i>M. ruminantium</i>	7.0	37–39	Cocobacillus	N	+	31
		<i>Methanococcus sohar</i>	6.5–8.0	35–40	Irregular coccus	M	–	30
		<i>M. deltar</i>		37	Irregular coccus	N	–	38
		<i>M. maripaludis</i>	6.5–8.0	35–40	Irregular coccus	M	–	33
		<i>M. thermophilus autotrophicus</i>	6.5–8.0	65 [†]	Irregular coccus	M	–	34
		<i>Methanoplanus lamicola</i>	7.0	40	Plate	M	–	48
		<i>Methanogenium curtaci</i>	6.2–6.6	20–25	Irregular coccus	N	–	49.2
		<i>M. nasutiformis</i>	6.8–7.3	20–25	Irregular coccus	N	–	51–62
		<i>M. olentangyi</i>		37	Irregular coccus	N	–	54.4
		<i>M. nati</i>	7.0	37–40	Irregular coccus	N	–	54
		<i>M. thermophilum</i>	6.5–7.2	55–60 [†]	Irregular coccus	N	–	56–60
		<i>M. boumense</i>	6.3–6.8	35–42	Irregular coccus	N	–	59
		<i>Methanocorpusculum aggregans</i>	6.4–7.2	35–37	Irregular coccus	N	–	52

A continuación, en la figura 2, se muestra un árbol filogenético de los microorganismos metanogénicos.

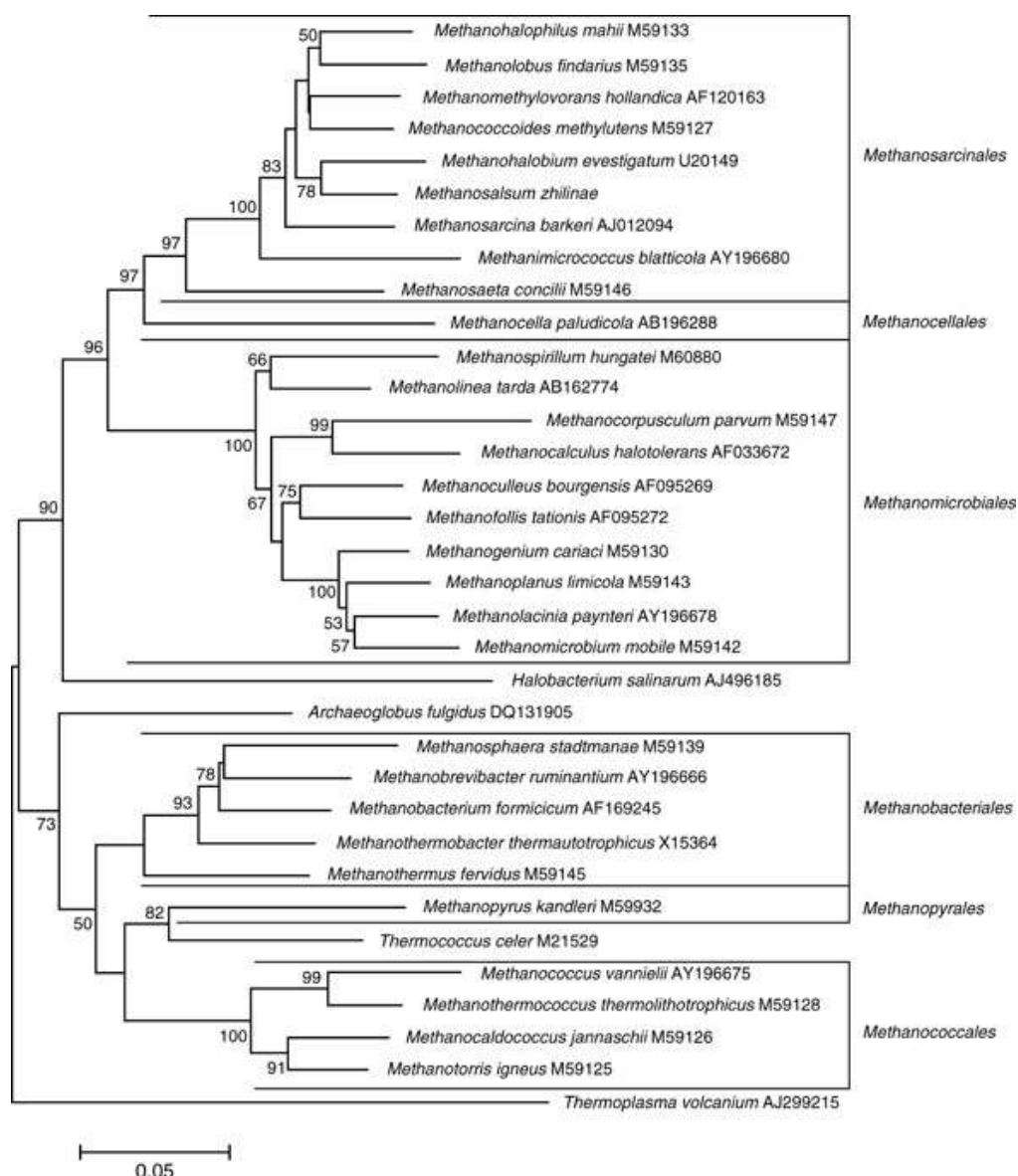


Figura 2. Árbol filogenético de las arqueas metanogénicas y otros euryarchaeotes basado en las secuencias del 16S rRNA (Whitman *et al.*, 2001).

1.2.2. Bacterias hidrolíticas, acidogénicas y acetogénicas

La comunidad bacteriana presente en un digestor anaerobio es muy diversa y compleja, pudiéndose diferenciar de forma simplificada entre bacterias hidrolíticas, acidogénicas o fermentativas y sulfatoreductoras. La abundancia relativa de bacterias dentro de un digestor anaerobio típico a menudo es mayor de 10^{16} células/ml. Esta población consiste en bacterias sacarolíticas (aprox. 10^8 células/ml), bacterias proteolíticas (aprox. 10^6 células/ml), bacterias lipolíticas (10^5 células/ml) y metanogénicas (10^8 células/ml) (Gerardi *et al.*, 2003).

Diversos estudios de identificación de bacterias en procesos de digestión anaerobia han detectado, principalmente, 4 phylum con diferente abundancia relativa: Chloroflexi, Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes (Rivière *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012b; Wirth *et al.*, 2012; Sundberg *et al.*, 2013) aunque la comunidad bacteriana es altamente

influenciada por las características del sustrato, así como por las condiciones de operación (Sundberg *et al.*, 2013).

Las bacterias hidrolíticas en procesos de digestión anaerobia se encuentran dentro de 5 phylums: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacter*, *Spirochaetes* y *Thermotogae* (Azman *et al.*, 2015). *Firmicutes* y *Bacteroidetes* forman el grupo más abundantes de bacterias hidrolíticas, aunque su abundancia relativa depende del inóculo y del tipo del reactor, según lo revisado por Azman *et al.* (2015). Entre los principales géneros de microorganismos hidrolíticos se encuentran *Clostridium*, *Acetovibrio*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Hernández, 2005). En la Tabla 2 se muestran algunas características de las especies típicas de bacterias hidrolíticas, sus sustratos y productos.

Tabla 2. Productos, sustratos y una aplicación de especies típicas de bacterias hidrolíticas (Amani *et al.*, 2010).

Substrates	Products	Typical species	Gram reaction	Shape	Motility*	Remark	Reference
Proteins	Amino acids, sugars	<i>Clostridium sp.</i>	+	rod	M	Brewery yeast waste treatment	Kim <i>et al.</i> (2009)
		<i>Proteus vulgaris</i>	-	rod	M	Directed evolution of a lipase	Fang <i>et al.</i> (2009)
		<i>Peptococcus sp.</i>	-	rod	M	Fermentation of glutamic acid	Westlake <i>et al.</i> (1976)
		<i>Bacteroides sp.</i>	-	rod	N	Induction of cell populations in peripheral lymph	Ochoa-Re-páraz <i>et al.</i> (2008)
		<i>Bacillus sp.</i>	+	rod	M	Syntrophic culture with <i>Clostridium</i>	Chang <i>et al.</i> (2008)
		<i>Vibrio sp.</i>	-	rod	M	Determine the effectiveness of freshly grown <i>vibrio spp.</i> for acute toxicity	Parvez <i>et al.</i> (2008)
Carbohydrates	Sugars	<i>Clostridium sp.</i>	+	rod	M	Palm oil mill effluent treatment	Chong <i>et al.</i> (2009)
		<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	-	rod	M	Degradation of cellulose to CH ₄	Khan (1980)
		<i>Staphylococcus sp.</i>	+	sphere	N	Co-metabolism in the presence of glucose	Zhangova <i>et al.</i> (2009)
		<i>Bacteroides sp.</i>	-	rod			
Lipids	Higher fatty acids, alcohols, amino acids	<i>Clostridium sp.</i>	+	rod	M	Food waste treatment	Jo <i>et al.</i> (2008)
		<i>Micrococcus sp.</i>	+	sphere	N	Isolation of bio-surfactants from <i>Micrococcus sp.</i>	Tuleva <i>et al.</i> (2009)
RNA	Sugars	<i>Staphylococcus sp.</i>	+	sphere	N		
	Purines, pyrimidines						
DNA		<i>Bacillus sp.</i>	+	rod	M		

Tras la etapa de hidrólisis, las diferentes rutas de fermentación son llevadas a cabo por diferentes géneros bacterianos: *Saccharomyces* (fermentación alcohólica), *Butyribacterium* y *Clostridium* (fermentación butírica), *Lactobacillus* y *Streptococcus* (fermentación del lactato) y *Clostridium* (fermentación del propionato). La población acidogénica es la más grande, suponiendo cerca del 90 % de la población total de un digestor. Algunos de los microorganismos presentes dentro de este grupo son: *Acinetobacter Lwoffii*, *Acinetobacter sp*, *Actinomyces sp*, *Alcaligenes*, *Pasteurella sp*, *Staphylococcus hominis*, *Bacillus*, *Klebsiella oxytoca*, *Clostridium spp*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium*, *Delsulphovibrio spp*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y *Escherichia coli* (Ghaly *et al.*, 2000; Schink, 2008).

La velocidad de crecimiento de las bacterias acidogénicas es notablemente más alta comparada con la de las metanogénicas y son capaces de sobrevivir a condiciones extremas como un pH bajo, altas temperaturas y altas cargas orgánicas (OLR en inglés) (Ahrling *et al.*, 2001). En la Tabla 3 se muestran algunas características de las especies acidogénicas.

Las bacterias acetogénicas convierten los ácidos grasos volátiles y alcoholes en acetato, H₂, formiato y CO₂, que serán los sustratos para las metanogénicas y las bacterias sulfatoredutoras. En cuanto a velocidad de crecimiento, generalmente, las acetogénicas crecen mucho más rápido que las metanogénicas, con un valor de la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de 1h⁻¹ frente a 0,04h⁻¹ (Shigehisa y Takane, 1994). Algunas de estas especies bacterianas, así como sus sustratos y productos se muestran en la Tabla 4. Es importante destacar que las bacterias que producen hidrógeno están obligatoriamente ligadas a los microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos y las bacterias sulfatoredutoras que lo consumen. Únicamente cuando estos microorganismos mantienen la concentración de hidrógeno suficientemente baja, las bacterias que lo producen pueden crecer. Asimismo, el crecimiento de metanogénicas que consumen hidrógeno está obligatoriamente ligado al crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno porque son éstas las que les proporcionan el sustrato necesario para su crecimiento. Esta relación entre los dos grupos de microorganismos se denomina de obligada sinergia. El descubrimiento de estas bacterias puso en evidencia el proceso de transferencia de interespecies de hidrógeno.

Tabla 3. Productos, sustratos y una aplicación de especies típicas de bacterias acidogénicas (Amani *et al.*, 2010).

Substrates	Products	Typical species	Gram reaction	Shape	Motility*	Remark	Reference
Amino acids	Valerate, Isovalerate, propionate, butyrate,	<i>Lactobacillus</i> sp.	+	rod	N	Production of γ -aminobutyric acid	Kim <i>et al.</i> (2009)
		<i>Escherichia coli</i>	-	rod	M	Synthesis of nitrobenzocyclophosphamide	Li <i>et al.</i> (2003)
	acetate, H ₂ , Higher fatty acids	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	sphere	N		
		<i>Bacillus</i> sp.	+	rod	M		
		<i>Pseudomonas</i> sp.	-	rod	M	Biodegradation of mixture of various textile dyes	Kalyani <i>et al.</i> (2009)
		<i>Micrococcus</i> sp.	+	sphere	N		
		<i>Eubacterium limosum</i>	+	rod	M	Biotransformation isoflavonoids biochanin	Hur and Rafii (2000)
		<i>Clostridium</i> sp.	+	rod	M	Hydrogen production from sucrose	Fritsch <i>et al.</i> (2008)
		<i>Zymomonas mobilis</i>	-	rod	M	Ethanol production	Wilkins (2009)
		<i>Eubacterium</i> sp.	+	rod	M	Hydrogen production	Kalyani <i>et al.</i> (2009)
Sugars	CO ₂ , H ₂ , formate, acetate, butyrate	<i>Escherichia coli</i>	-	rod	M		
	CO ₂ , H ₂ , formate, acetate, ethanol, lactate						
	Formate, acetate, ethanol, lactate	<i>Bifidobacterium</i> sp.	+	rod	N	Production of bacteriocin	Cheikhroussel <i>et al.</i> (2009)
	Acetate	<i>Acetobacterium</i> sp.	-	ellipse	M	Production of vitamin B ₁₂	Bainotti <i>et al.</i> (1996)
Fatty acids	Valerate, isovalerate, propionate, butyrate, acetate, H ₂	<i>Clostridium</i> sp.	+	rod	M		
Alcohols		<i>Syntrophomonas wolfei</i>	-	rod	M	Oxidation of fatty acids	McInerney <i>et al.</i> (1981)

Tabla 4. Productos, sustratos y características de algunas bacterias acetogénicas identificadas (Amani *et al.*, 2010).

Substrate	Product	Typical species	Temperature, °C	Gram reaction	Shape	Motility*	G+C content (mol%)
Butyrate	Acetate	<i>Syntrophobacter wolfeii</i>	35-40	-	rod	N	56.7-60.6
	H ₂ /CO ₂ , Formate	<i>S. fumaroxidans</i>	35-40	-	rod	N	60.6
Propionate	H ₂ /CO ₂ , Formate	<i>Syntrophomonas wolfei</i>	35-40	-	rod	M	44.9
		<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	50-60	+	rod	M	52.8
	Butyrate, acetate	<i>P. schinkii</i>	32-37	+	rod	M	53.7
		<i>Smithella propionica</i>	35-40	-	rod	M	49.0
H ₂ , CO ₂	Acetate	<i>Clostridium acetivum</i>	30-37	-	rod	M	42.3

Los miembros del phylum *Firmicutes* son conocidos como bacterias fermentativas y sintróficas capaces de degradar varios ácidos grasos volátiles (AGV) (García-Peña *et al.*, 2011). El predominio de *Firmicutes* es una indicación clara de que estos productos están fácilmente disponibles debido a la previa fermentación de estos ácidos grasos volátiles simples. Dentro de este phylum, *Bacilli* (76.1%) y *Clostridia* (13.3%) constituyen las clases mayoritarias. Especies *Lactobacillus* dentro de la clase *Bacilli* son fermentadores comunes de alimentos y pueden

crecer a partir de varios carbohidratos (Jo *et al.*, 2007). Algunas especies *Clostridium* de la clase *Clostridia* como *C. aminobutyricum* y *C. sticklandii*, son microorganismos capaces de utilizar aminoácidos y producir acetato, butirato y amonio (Shin *et al.*, 2010). El papel sintrófico de *Firmicutes* involucra la eliminación de H_2 y tiene implicaciones inmediatas en la composición de la comunidad de metanogénicas.

El phylum *Bacteroidetes* consta de bacterias proteolíticas (Kindaichi *et al.*, 2004). La mayoría de los microorganismos proteolíticos son también capaces de metabolizar carbohidratos para producir ácidos grasos volátiles.

Las bacterias filamentosas dentro del phylum *Chloroflexi* son muy comunes y abundantes en EDAR urbanas e industriales (Beer *et al.*, 2002; Björnsson *et al.*, 2002; Kragelund *et al.*, 2007; Speirs *et al.*, 2009). Este phylum juega un papel importante en la formación del flóculo (Kragelund *et al.*, 2011) y en la aparición de episodios de *bulking* de forma ocasional (Jenkins *et al.*, 2004; Kragelund *et al.*, 2006). Dentro del phylum *Chloroflexi* se han descrito cuatro clases bien diferenciadas: *Anaerolineae*, *Dehalococcoidetes*, *Chloroflexi* y *Thermomicrobia* (Hugenholtz y Stackebrandt, 2004), siendo la más abundante en fangos activos la clase *Anaerolineae* (Sekiguchi *et al.*, 1999; Björnsson *et al.*, 2002). El phylum *Chloroflexi* engloba muchos morfotipos, como el 0092, el 0803 y el 0914. Algunos miembros de este phylum *Chloroflexi* juegan un papel importante como bacterias que degradan la glucosa (Ariesyady *et al.*, 2007).

Miembros del phylum *Actinobacteria* han sido aislados de digestores anaerobios tratando residuos de tofu (Ling *et al.*, 1996). Estas especies son principalmente sacarolíticas y no pueden realizar actividad proteolítica. Algunas bacterias producen ácido propiónico durante la digestión anaerobia (Nelson *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2014).

La mayoría de los organismos de *Alfa*, *Beta*, *Gamma* y *Delta proteobacteria* del phylum *Proteobacteria* son conocidos como bacterias que utilizan la glucosa, el propionato, butirato y el acetato (Ariesyady *et al.*, 2007).

1.2.3. Bacterias Sulfatoreductoras (SRB)

En competencia con las bacterias metanogénicas existe otro grupo de bacterias, denominadas bacterias sulfatoreductoras (SRB) que también son capaces de consumir ácidos grasos volátiles e hidrógeno (H_2) en presencia de sulfato. Las SRB son consideradas anaerobias estrictas, aunque existen algunas especies que poseen mecanismos de protección eficientes y son capaces de sobrevivir y mantener su actividad metabólica en ambientes regularmente afectados por oxígeno (Dolla *et al.*, 2006; Bryukhanov *et al.*, 2007). Suelen ser dominantes en ecosistemas naturales tales como sedimentos marinos y de agua dulce y también en digestores anaerobios en los que la metanogénesis se ve inhibida por la presencia de sulfato.

Las bacterias SRB engloban distintas especies cuya principal característica común es la utilización del sulfato (SO_4^{2-}) como aceptor de electrones quedando reducido en forma de sulfuro (S^{2-}). En función del pH del sistema el sulfuro puede estar en forma de sulfuro o de ácido sulfhídrico (H_2S), que es un gas sumamente corrosivo y causante de malos olores. Además de la disminución en la producción de metano, la proliferación de las bacterias SRB supone un grave problema de operación porque dificulta la utilización del biogás formado con fines energéticos por el alto grado de corrosión de motores y turbinas que provoca el H_2S .

Las bacterias SRB pueden crecer de forma heterótrofa, cuya fuente de carbono y energía son los ácidos grasos volátiles y de forma autótrofa utilizando el hidrógeno como fuente de energía y su

fuelle de carbono es el CO_2 (Nagpal *et al.*, 2000; Lens *et al.*, 2001). Algunas SRB puede degradar complejos moleculares como compuestos aromáticos utilizando como dadores de electrones el hidrógeno (H_2), acetato, lactato, butirato y propionato (Hao *et al.*, 1996; Fukui *et al.*, 1999). Estas bacterias ven inhibido su crecimiento por una excesiva acumulación de ácido sulfhídrico en su forma no disociada (H_2S).

En la búsqueda de una clasificación para estos microorganismos se han utilizado muchas de sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Una forma tradicional muy sencilla y adecuada de clasificarlas viene dada en función a su capacidad para degradar la materia orgánica en forma parcial o total. Así, se pueden dividir en dos grandes grupos:

1). Las oxidantes incompletas del sustrato, que generan acetato como producto final utilizando lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos como fuente de carbono y energía para reducir el sulfato a sulfuro. Bajo condiciones ideales tienen una velocidad de crecimiento mucho más rápida que las oxidantes completas y pueden lograr tiempos de duplicación de 3 a 4 horas, si son alimentadas con los sustratos que lo favorecen, como hidrógeno y lactato. Este grupo está constituido por géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium*.

2). Las oxidantes completas del sustrato a dióxido de carbono y sulfuro. Estos géneros utilizan ácidos grasos, especialmente acetato. Tienen un crecimiento lento, frecuentemente con tiempos de duplicación mayores a 20 horas. El grupo está compuesto por *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium* (Nagpal *et al.*, 2000; Visser *et al.*, 1995; Widdel *et al.*, 1988).

En el tratamiento de aguas residuales con altos niveles de sulfato, las SRB compiten con las bacterias fermentativas o acidogénicas por los productos de la hidrólisis, con las bacterias acetogénicas por sustratos intermediarios como los ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes, y con las bacterias metanogénicas por los sustratos menos complejos como hidrógeno y acetato. El resultado de esta competencia es importante porque determina el rendimiento de los productos finales de la mineralización (sulfuro y metano). La actividad de las sulfato-reductoras depende principalmente de la disponibilidad de sulfato.

La cinética de competencia por los dadores de electrones disponibles entre las SRB y las metanogénicas ha sido objetivo de numerosos estudios (Abram *et al.*, 1978; Kristjansson *et al.*, 1982; Schonkeit *et al.*, 1982). Las SRB, aparentemente, tienen más afinidad por el hidrógeno y el acetato, los dos principales precursores de metano, en relación con las metanogénicas. Esto se explica en base a sus propiedades cinéticas, la velocidad máxima de crecimiento (V_{\max}) y la concentración de sustrato a la cual la velocidad es la mitad de la V_{\max} (K_m), (Tabla 5), y dadas las condiciones termodinámicas favorables (Widdel *et al.*, 1988). Por lo tanto, las metanogénicas tienden a dominar en ambientes con bajas concentraciones de sulfato (Stams AJ., 1994).

Tabla 5. Valores de K_m y V_{\max} .

Bacteria	Substrate	K_m (mM substrate)	Refer- ence	V_{\max} (mM substrate removed/g of VSS ^a per day)	Refer- ence
SRB	Acetate	0.2	19	74	8
	Hydrogen	0.001	11	112	18
MPB	Acetate	3.0	19	45	23
	Hydrogen	0.006	11	123	18

^a VSS, Volatile suspended solids.

A pesar de que las consideraciones termodinámicas y cinéticas favorecen a las bacterias sulfato-reductoras en la competencia por los sustratos disponibles de la digestión anaerobia (Colleran *et al.*, 1995), en la práctica se ha observado que el resultado de la competencia puede ser afectado por diversos factores como la concentración de la materia orgánica y sulfato, la relación, el tipo de sustrato, la presencia de metales traza y otros nutrientes, el tipo de inóculo, las propiedades de inmovilización, la duración del experimento, los factores ambientales como pH y temperatura, y la inhibición por sulfuros (Patidar *et al.*, 2005).

En la figura 3 se recogen los procesos que tienen lugar en un digestor anaerobio en presencia de sulfato.

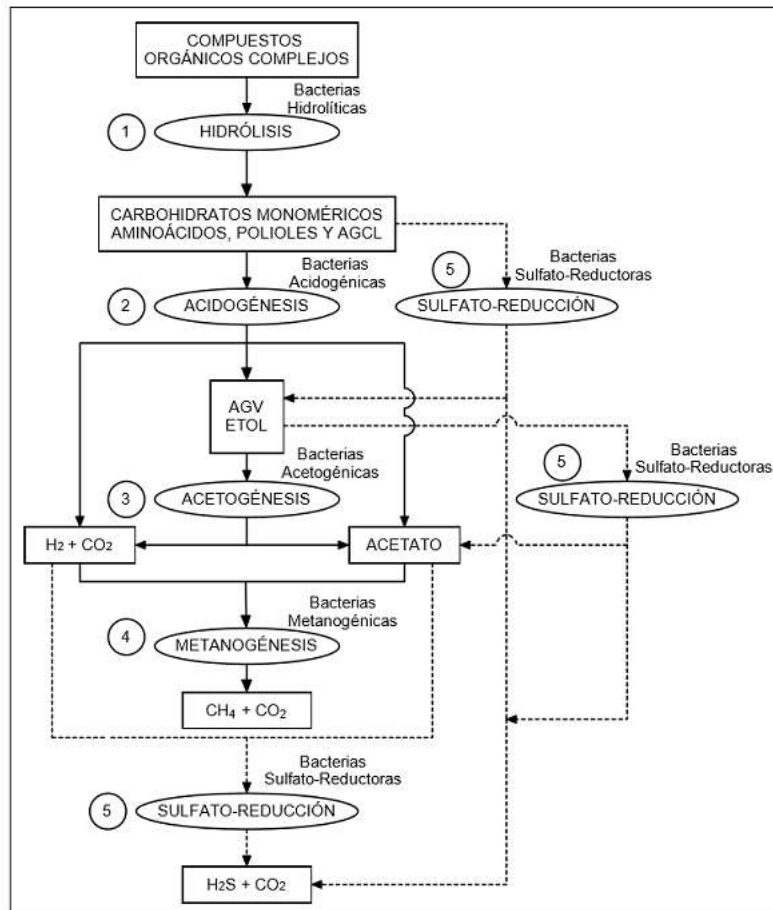


Figura 3. Degradación anaerobia en presencia de sulfato. (AGCL): Ácidos grasos de cadena larga, (AGV): ácidos grasos volátiles, (ETOL): etanol. Adaptado de López (2007) y Bijmans (2008).

Sin embargo, existen unas condiciones durante las cuales la metanogénesis y la reducción de sulfato no compiten y ocurren simultáneamente. Esto es cuando el metano es producido a partir de metanol y/o aminas metiladas, sustratos por los que las SRB muestran relativamente baja afinidad. Esto ocurre en ambientes salinos o hipersalinos. El metanol es formado durante la descomposición anaerobia de pectinas (Schink *et al.*, 1980).

Las SRB dominantes en estos sistemas pertenecen a las familias *Desulfovibrionaceae* y *Desulfobacteraceae* dentro de la clase *Deltaproteobacteria* (Manz *et al.*, 1998). *Desulfobacteraceae* es un grupo de SRB oxidantes completos que consumen propionato, pero no glucosa.

Daly *et al.* (2000) clasificó a las SRB más conocidas y representativas restringiéndose a géneros mesófilos dentro de la subdivisión Deltaproteobacteria y gram (-/+) agrupándolos en seis grupos filogenéticos distintos:

- Grupo 1: *Desulfotomaculum* (DFM)
- Grupo 2: *Desulfobulbus* (DBB)
- Grupo 3: *Desulfobacterium* (DBM)
- Grupo 4: *Desulfobacter* (DSB)
- Grupo 5: *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina* (DCC)
- Grupo 6: *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium* (DSV)

Según el manual Bergey's (2001) la taxonomía de algunas sulfato-reductoras queda de la siguiente manera:

Dominio: *Bacteria*
Phylum BXII: *Proteobacteria*

Clase VI: *δ-proteobacteria*
Orden II: *Desulfovibrionales*
 Familia I: *Desulfovibrionaceae*
 Género I: *Desulfovibrior*
 Familia II: *Desulfomicrobiaceae*
 Género I: *Desulfomicrobium*
 Familia III: *Desulfohalobiaceae*
 Género II: *Desulfomonas*
Orden III: *Desulfobacterales*
 Familia I: *Desulfobacteraceae*
 Género I: *Desulfobacter*
 Género II: *Desulfobacterium*
 Género III: *Desulfobacula*
 Género V: *Desulfococcus*
 Género VI: *Desulfofaba*
 Género VII: *Desulfofrigus*
 Género VIII: *Desulfonema*
 Género IX: *Desulfosarcina*
 Familia II: *Desulfobulbaceae*
 Género I: *Delsulfobulbus*
 Género II: *Desulfocapsa*
 Género III: *Desulfofustis*
 Género IV: *Desulforhopalus*
Orden IV: *Desulfuromonadales*
 Familia I: *Desulfuromonadaceae*
 Género I: *Desulfomonas*

1.3. Influencia de distintos parámetros sobre el proceso anaerobio

La digestión anaerobia de la materia orgánica es un proceso complejo que involucra diferentes pasos de degradación. Los microorganismos que participan en el proceso pueden ser específicos para cada etapa y, por lo tanto, estos podrían tener diferentes requisitos ambientales (Khalid *et al.*, 2011), por lo que diversos parámetros deben ser controlados durante el proceso con el fin de mantener el equilibrio y la composición del biogás. A continuación, se detallan estos parámetros operacionales y químicos.

- **Temperatura:** la digestión anaerobia puede llevarse a cabo en dos rangos diferentes de temperatura, el denominado mesofílico, 30-38 °C, siendo la temperatura más utilizada 35°C y el termofílico, siendo su intervalo de operación entre 50-60°C, aunque 54 °C suele ser la temperatura más alta a la que se mantiene un digestor. Trabajar a temperaturas más elevadas permite utilizar tiempos de retención menores además de una mayor producción de metano. Sin embargo, por razones prácticas, los digestores funcionan dentro del tramo mesofílico con una temperatura próxima a los 35°C, ya que esta temperatura combina las mejores condiciones de crecimiento de las bacterias con la mayor velocidad de producción de metano, aunque en el termofílico se elimina un mayor número de agentes patógenos pero algunas sustancias comienzan a comportarse como inhibidores a esas temperaturas. El calor generado al quemar el gas se puede utilizar para mantener la temperatura deseada en el digestor.
- **pH:** las arqueas metanogénicas son muy sensibles a pequeños cambios del pH. Valores del pH fuera del intervalo 6-8 hacen el proceso inviable debido a la elevada toxicidad de las formas no ionizadas de los ácidos volátiles y del amoníaco predominantes por debajo y por encima respectivamente de esos valores de pH. Por otro lado, los microorganismos fermentativos son menos sensibles a cambios en el pH y pueden funcionar en un amplio rango de pH entre 4 y 8,5 siendo el pH óptimo para la acidogénesis entre 5,5 y 6,5 (Yang *et al.*, 2003). Esta diferencia de pH entre las fases de acidogénesis y metanogénesis se podría solucionar empleando un digestor de 2 etapas en serie, ya que un pH bajo inhibe el crecimiento de las metanogénicas y como consecuencia, reduce la cantidad y calidad del biogás y la eliminación de materia orgánica.
- **Alcalinidad:** la estabilidad del proceso depende de la capacidad tamponante del contenido del digestor, que viene dada por su alcalinidad. Los valores normales de la alcalinidad en el interior del digestor varían entre 1500 y 5000 mg/l como CaCO₃, siendo el intervalo óptimo 2000-2500 mg/l. Cuanto mayor es la alcalinidad, mayor es la capacidad para resistir cambios en el pH. El proceso de fermentación provoca una reducción de la alcalinidad, y el de metanogénesis un incremento. El conjunto de ambos procesos da lugar a una ligera disminución de alcalinidad. En aguas con baja alcalinidad esta disminución puede provocar una bajada significativa del pH que inhiba el proceso de metanogénesis.
Manteniendo un cociente ácido volátiles/alcalinidad constante por debajo de 0,25 es posible mantener la capacidad tamponante del sistema mientras que valores de este cociente por encima de 0,8 indican que se ha producido una inhibición de la metanogénesis. Por último, valores por encima de 0,3-0,4 indican que existen problemas y que deben tomarse medidas correctoras.
- **Relación C/N:** se debe mantener una relación C/N adecuada para evitar la acumulación de amonio que conduciría a la inhibición del proceso. Según Chen Y. *et al.* (2008), cuando la concentración de amonio está en el rango de 1700-14000 mg/L podría causar inhibición. El amoníaco puede afectar a las metanogénicas de dos formas (Rajagopal *et al.*, 2013): el ion amonio podría inhibir las enzimas encargadas de la producción de metano y, en segundo lugar, la molécula de amoníaco puede difundirse al interior de las células y causar desequilibrio de protones y deficiencia de potasio. Para controlar la inhibición por amonio, la opción más fácil y barata es la optimización del alimento al digestor mediante procesos de codigestión. Hills (1979) y Backus *et al.* (1988)

demonstraron que la producción de metano y el porcentaje en el biogás son afectados por la relación C/N.

- **TRC:** se recomienda mantener el tiempo de retención en un valor alrededor de dos veces mayor que el tiempo necesario para el crecimiento de los microorganismos más lentos, es decir, los metanogénicos. Sin embargo, el tiempo de retención puede cambiar de un día a otro con el cambio del alimento, o de estación a estación por el cambio de las temperaturas (en caso de que la temperatura no esté controlada). Por lo tanto, su valor óptimo varía según la tecnología, los detalles del proceso, temperatura, y composición del residuo (Buekens, A. 2005).
- **Contenido en humedad:** Es uno de los factores más importantes que afecta a estos procesos. Según García-Peña *et al.* (2011), la humedad ayuda a la digestión por varios motivos:
 - Controlar la turgencia celular.
 - Transportar nutrientes, intermedios, productos, enzimas y microorganismos.
 - Reaccionar en la hidrólisis de materia orgánica compleja.
 - Modificar la forma de las enzimas y otras macromoléculas. El alto contenido de humedad facilita, normalmente, la digestión anaerobia debido al hecho de que las cantidades de agua pueden afectar al rendimiento del proceso disolviendo la materia orgánica fácilmente degradable.
- **Carga orgánica (OLR, Organic loading rate):** La producción de biogás es altamente dependiente de la carga orgánica. Al aumentar la OLR aumenta la población de bacterias acidogénicas que producen ácidos y se multiplican rápidamente. Sin embargo, las metanogénicas crecen más lentamente que las bacterias acidogénicas y necesitan más tiempo para aumentar su población y podrían no ser capaces de consumir todos los ácidos producidos por las acidogénicas al mismo ritmo. Esto conduciría a una caída del pH y, por lo tanto, a una inhibición de las metanogénicas.
- **Sustancias tóxicas e inhibidoras:** Una amplia variedad de sustancias orgánicas e inorgánicas pueden inhibir el proceso de digestión anaerobia. La inhibición es generalmente indicada por una disminución de la población microbiana y de la producción de metano, la desaparición del hidrógeno, la acumulación de AGV, y la reducción de pH. Significantes investigaciones han sido llevadas a cabo para establecer niveles inhibitorios de compuestos específicos en la digestión anaerobia. Sin embargo, estos niveles están muy influenciados por la estructura y actividad de la comunidad microbiológica (Yamrot *et al.*, 2018).

Como ya se ha comentado, los AGV pueden inhibir el crecimiento de las metanogénicas si su concentración está por encima de un cierto nivel. Además, cada AGV muestra un comportamiento diferente cuando inhibe a estos microorganismos. Por ejemplo, el ácido propiónico se produce menos y apenas es consumido, pero su presencia es crucial para la estabilidad de las metanogénicas (Van Kuijk *et al.*, 1998; De Bok *et al.*, 2004; Nosrati *et al.*, 2004; Gallert *et al.*, 2008).

Los iones de metales ligeros en concentraciones traza son esenciales para el crecimiento de metanogénicas. Sin embargo, altas concentraciones inhiben la actividad e interfieren con el metabolismo de los microorganismos anaerobios. La adición simultánea de calcio y potasio en concentraciones adecuadas ayuda a mejorar la eficiencia del tratamiento anaerobio al reducir la toxicidad del sodio (Bashir *et al.*, 2004). Por otro lado, los metales pesados (Cr^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , y Ni^{2+}), a diferencia de muchas otras sustancias tóxicas, no son biodegradables y se pueden acumular a concentraciones potencialmente tóxicas provocando el desajuste de la función de las enzimas. Las bacterias acidogénicas son más resistentes a la toxicidad de estos metales que las metanogénicas (Zayed *et al.*, 2000).

En la Tabla 6 se muestran los valores óptimos y extremos de algunos parámetros en digestores anaerobios.

Tabla 6. Condiciones óptimas y extremas para digestores anaerobios (Amani *et al.*, 2010).

Parámetro	Unidad	Óptimo	Extremo
Ácidos grasos volátiles	mg/l (como ácido acético)	50-500	500-2000
Carga orgánica			
Mesofílico	Kg SSV/m ³ ·día	0,8-2	0,4-6,4
Termofílico	Kg SSV/m ³ ·día	1,5-5	1-7,5
Temperatura			
Mesofílico	°C	32-37	20-42
Termofílico	°C	50-60	45-65
pH		6,8-7,4	6,3-7,9
Relación C:N		25:1	-
Alcalinidad	mg CaCO ₃ /l	1300-3000	1000-5000
Tiempo de retención hidráulico	días	12-18	7-30
Composición del biogás			
Metano	% en volumen	65-70	60-75
Dióxido de Carbono	% en volumen	30-35	25-40

1.4. Técnicas moleculares para la caracterización de comunidades microbianas

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando asociaciones-comunidades donde generalmente existen como miembros de poblaciones mixtas y su aislamiento en un medio definido es complicado. Su identificación mediante métodos convencionales requiere el aislamiento de cultivos puros, que además resultan inadecuados para el estudio de la biodiversidad en una población mixta.

La posibilidad de identificar poblaciones específicas de microorganismos de muestras ambientales sin necesidad de aislamiento e identificación mediante métodos culturales está revolucionando la ecología microbiana, dado que están surgiendo nuevas aplicaciones y técnicas. Entre las técnicas independientes del cultivo más utilizadas se encuentran técnicas

genético-moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la microscopía de fluorescencia (FISH). La principal ventaja de estas técnicas frente a las dependientes del cultivo es que son más rápidas dado que no hay que aislar el microorganismo, pero son más costosas además de requerir personal más especializado. Además, presentan una mayor especificidad que la microscopía convencional y sensibilidad y requieren conocer la secuencia de cada grupo o microorganismo. Sin embargo, la PCR requiere extracción del ADN para posteriormente visualizarlo por electroforesis.

1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1987 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo, resultado mucho más fácil la identificación de organismos. La reacción se lleva a cabo en un termociclador al añadir los siguientes componentes:

- **ADN molde**, ADN a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el ADN que queremos amplificar. La concentración del ADN molde en la reacción depende de la fuente utilizada, requiriéndose aproximadamente de 300 nanogramos a 1 microgramo de ADN genómico.
- **DNA polimerasa**, enzima capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la esta enzima. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio. Existe una gran variedad de polimerasas con diferentes capacidades a la hora de trabajar con diferentes temperaturas. La más habitual es la Taq DNA polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus* ya que es capaz de funcionar a altas temperaturas.
- **Cebadores o primers**, oligonucleótidos sintéticos iniciadores de la reacción cuya secuencia de entre 15-30 nucleótidos es complementaria a la hebra molde. Son necesarios por tantas moléculas cortas de ADN de cadena sencilla.
- **Nucleótidos libres**. Las enzimas DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos libres. Concentraciones entre 20 y 200 micromolar proporcionan resultados óptimos, ya que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción.
- **Buffer**, solución específica que magnifica la actividad de la polimerasa y mantiene el pH adecuado para su funcionamiento, normalmente contiene cloruro de magnesio.
- **Iones divalentes**, actúan como cofactores de la polimerasa, generalmente en forma de cloruro de magnesio.

El proceso se da en 3 fases que están muy ligadas a la temperatura y son las siguientes:

- **Desnaturalización**: las dos cadenas del ADN se separan al elevar la temperatura aproximadamente a 90°C.
- **Hibridación**: tiene lugar un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al ADN molde. Las temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C, dependiendo de los cebadores.

- **Extensión:** la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. La temperatura de esta fase depende de la enzima polimerasa empleada. Si se utiliza la Taq polimerasa la temperatura suele ser de 72°C.

Tras un ciclo de PCR se obtiene únicamente una copia de un pequeño fragmento del ADN molde. En la figura 4 se muestra un esquema de las distintas fases del proceso de la PCR.

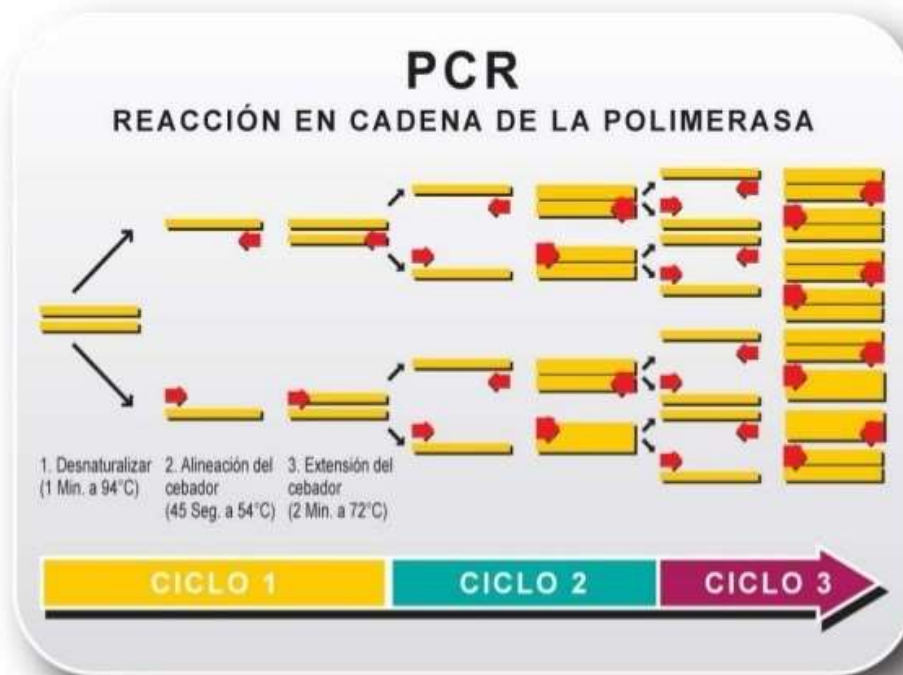


Figura 4. Fases del proceso de la PCR.

El procedimiento más común para el análisis de los fragmentos obtenidos en la PCR es la electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de acrilamida. La electroforesis permite separar fragmentos de acuerdo con su tamaño. Los fragmentos de ADN (cargados negativamente) se desplazan por el gel a través de un campo eléctrico hacia el polo positivo. Los fragmentos más pequeños migran más rápido y son los que vemos más abajo en el gel (Figura 5). La elección de la matriz (agarosa o acrilamida) y el porcentaje en la cual separar los productos, dependerá del tamaño de estos y los largos diferentes que deseemos separar. Generalmente, los geles de agarosa se visualizan agregando Bromuro de etidio, un agente que se intercala en el ADN y fluoresce cuando es expuesto a la luz UV, y en el caso de los geles de acrilamida, la tinción se realiza con nitrato de plata, que por interacciones electrostáticas se une al ADN.

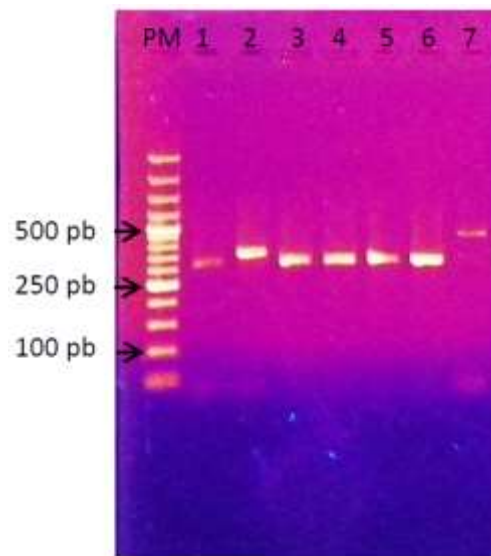


Figura 5. Visualización de los productos de PCR por electroforesis.

1.4.2. Hibridación fluorescente in situ (FISH)

La técnica FISH se basa en la capacidad de hibridación entre dos cadenas de oligonucleótidos complementarias. Para ello emplea un fragmento corto monocatenario de ADN (20-40 bases) marcado con un fluorocromo, al que se conoce como sonda, cuya secuencia es complementaria a la secuencia específica de un grupo o especie de microorganismos que se quiere identificar. De esta forma si esos microorganismos están presentes en la muestra y bajo ciertas condiciones se producirá la unión de ambas secuencias, permitiendo así la identificación rápida y específica de células microbianas mediante la transformación de la secuencia en algo visible. Posteriormente, con un microscopio de fluorescencia se observan las señales de la sonda. En la figura 6 se muestra un diagrama del proceso de unión de ambas secuencias.

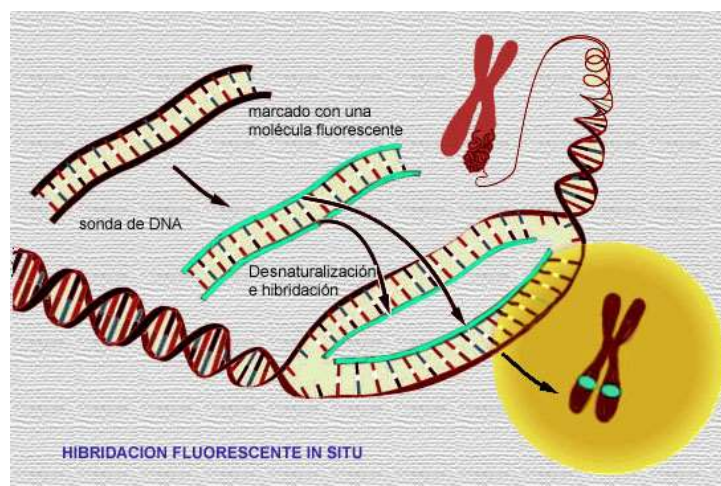


Figura 6. Diagrama del proceso FISH.

FISH nos permite identificar un microorganismo a nivel de especie diseñando sondas para ello. Esto es una gran ventaja ya que a largo plazo interesa conocer especies responsables de problemas importantes dentro de una EDAR, como el foaming.

Sin embargo, a pesar de su alta especificidad, FISH también presenta algunos problemas y limitaciones que se enumeran a continuación, así como las acciones para reducirlos:

- **Pérdida de fluorescencia:** se puede evitar utilizando reactivos 'antifading' que son moléculas que aportan al fluorocromo aquellos electrones que ha perdido por la emisión fluorescente.
- **Pérdida de bacterias:** se debe gelatinizar la superficie del portaobjetos sobre el que se coloca la muestra a analizar para conseguir una mejor adherencia de ésta y reducir la pérdida de microorganismos durante las posteriores fases del proceso, ya que la sensibilidad de la técnica depende del número de ribosomas existentes.
- **Problemas en el montaje** por el exceso o falta de antifading. Puede dar lugar a una elevada señal de background, dificultando la cuantificación de los microorganismos.
- **Baja señal por problemas de accesibilidad de la propia sonda:** utilizar helpers que son sondas no marcadas con un fluorocromo que abren la estructura secundaria facilitando la unión.
- **Baja señal por otros motivos:** se debe permeabilizar la célula añadiendo ciertos reactivos.
- **Disponibilidad de las sondas.** No existen sondas para la identificación de todos los microorganismos de interés en procesos microbiológicos.
- **Elevada autofluorescencia de las muestras:** en los fangos anaerobios el contenido en materia orgánica suspendida inerte es muy elevado, lo que significa que existe mucha materia inorgánica que tiene mucha autofluorescencia, lo que dificulta la identificación de los positivos, dando lugar a resultados erróneos.

Existe una base de datos llamada ProbeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase>) donde están publicadas algunas sondas de interés estudiadas para cada grupo de microorganismos, las condiciones que se deben utilizar para que el proceso se lleve a cabo de forma correcta y la publicación científica de la que se ha obtenido.

1.4.3. Microarrays

Los microarrays constituyen la última línea de técnicas basadas en la capacidad de hibridación entre dos cadenas de ADN complementarias. Básicamente un microarray o chip de ADN, consiste en una matriz de pocillos microminiaturizados sobre un soporte de vidrio en donde se implantan, utilizando diversas técnicas, cadenas simples de oligonucleótidos. El poder adherir una cadena corta de oligonucleótidos sobre una superficie plana es decisivo en el diseño de los microarrays.

En la figura 7 se observa un diagrama del proceso de esta técnica. En cada pocillo del chip, adherida por uno de sus extremos, existe una determinada cadena de oligonucleótido. Si se pone el microarray en contacto con una mezcla de cadenas simples de ADN a identificar (DNA1 y DNA2), marcadas fluorescentemente, éstas se hibridarán con su oligonucleótido complementario. Dado que se conoce la secuencia y distribución de los oligonucleótidos en el microarray podemos, al excitar el microarray con un láser y estar las cadenas hibridadas fluorescentemente, conocer la ubicación de las cadenas de estas y su secuencia

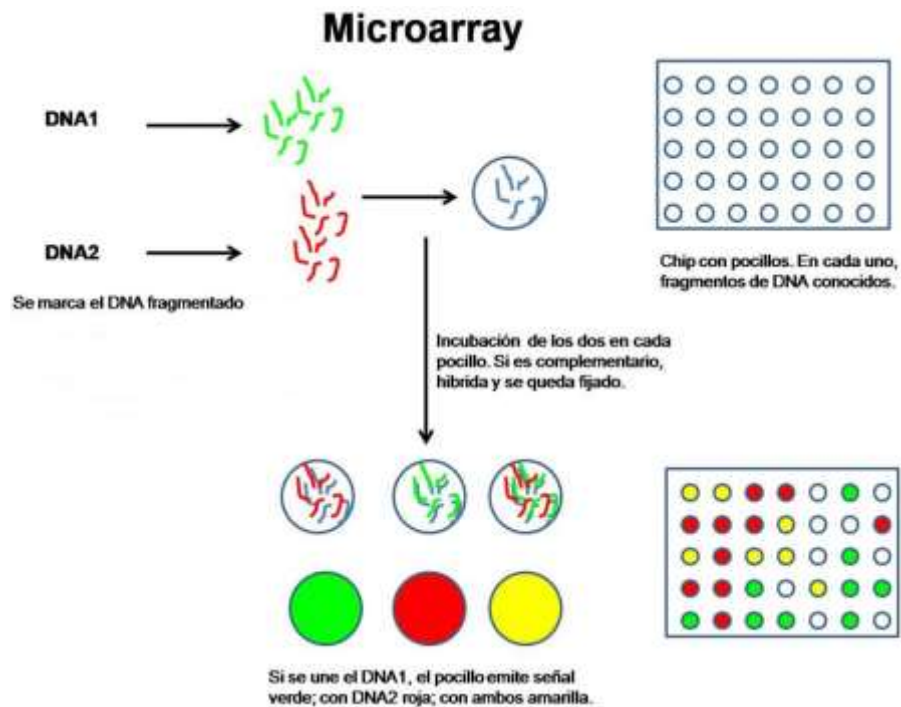


Figura 7. Diagrama del proceso de un Microarray.

Por lo tanto, esta técnica permite estudiar numerosos fragmentos de ADN y ARN en un pequeño chip al mismo tiempo, lo que ha supuesto una auténtica revolución en genética molecular (Shen *et al*; 2009).

1.4.4. NGS (Next Generation Sequencing)

Las técnicas de secuenciación masiva de ADN o también llamadas de nueva generación, NGS, se basan en la monitorización a tiempo real y en la detección de pirofosfato durante la síntesis de ADN. Cada vez que se une un nucleótido a la secuencia original, el establecimiento de un enlace químico provoca la liberación de una molécula de pirofosfato.

En general, el fundamento de todas las NGS es la capacidad de llevar millones de reacciones de amplificación de cadena de forma paralela junto a un método de identificación del nucleótido introducido en la cadena (Bubnoff, 2008).

Desde un punto de vista técnico y aunque existen distintos instrumentos y métodos de secuenciación masiva, la mayoría de las técnicas empleadas siguen un mismo esquema de trabajo que se puede resumir en:

- Fragmentación del ADN, generando fragmentos de un tamaño adecuado para cada tipo de secuenciación.
- Captura de las regiones ADN de interés para la preparación de una librería de fragmentos.
- Ampliación clonal de las secuencias capturadas.
- Secuenciación. Existen numerosos métodos de secuenciación. El sistema Illumina es el más usado actualmente. En este sistema, la secuenciación se lleva a cabo alternando ciclos de amplificación con terminadores reversibles (en cada ciclo, el nucleótido complementario al molde se une emitiendo fluorescencia en una longitud de onda

específica), y ciclos de toma de imágenes con un sistema óptico para la identificación de la base nitrogenada incorporada a la cadena nucleotídica creciente, dando lugar a lo que se conoce como lecturas. Los fragmentos de ADN son secuenciados desde los 32 extremos, creando lecturas apareadas conocidas como paired-ends, generando insertos de tamaño conocido que facilitan el correcto mapeo de las cortas secuencias.

Una vez realizada la secuenciación y utilizando diversos algoritmos bioinformáticos, las lecturas generadas son revisadas descartando aquellas con baja calidad. Las restantes son ensambladas y alineadas contra el genoma de referencia y se producen la identificación y la anotación de las variantes presentes con la información presente en las bases de datos.

Algunas ventajas presentadas por las NGS son que permiten generar gran cantidad de información bajo un mismo procedimiento; necesitan muy poca muestra para proceder, pudiendo algunas partir de 10ng de muestra en condiciones adecuadas para generar una secuencia consistente, y el tiempo empleado en la reacción es menor que la determinación de cada uno de los biomarcadores individualmente. La principal desventaja, su alto coste.

1.5. Proceso de codigestión

El proceso de codigestión consiste en la digestión anaerobia de una mezcla de dos o más sustratos con características diferentes para incentivar el potencial de biometanización de la mezcla resultante. La idea general es maximizar la producción de biogás añadiendo sustratos que producen más biogás por unidad de masa que el fango por sí sólo.

Sus objetivos generales son:

- Aprovechar la complementariedad de los compuestos para dar lugar a procesos más eficaces.
- Compartir instalaciones y unificar metodologías reduciendo así costes de inversión y explotación.
- Amortiguar las variaciones temporales en producción y composición de cada residuo por separado.

En el marco de esta alternativa, las infraestructuras de digestión anaerobia son adecuadas para tratar de forma conjunta y en la misma unidad de digestión, lodos, productos, subproductos o residuos de origen agrícola, alimentario e incluso industrial (con fuertes limitaciones en cuanto a contenidos contaminantes o tóxicos), incrementando de forma notable la producción de biogás. En algunas situaciones el biogás generado, adecuadamente tratado, puede satisfacer la demanda eléctrica total de una EDAR e incluso superarla, permitiendo la exportación del excedente generado a la red eléctrica de distribución, según diferentes modelos de retribución económica.

También se ha demostrado que con la codigestión se puede conseguir una mejor calidad agronómica del fango digerido (Di Maria *et al.*, 2014) mejorando así su uso potencial como fertilizante. Con esto se reducen notablemente los residuos generados en el proceso de tratamiento de aguas residuales.

En ensayos preliminares (Rong Xu *et al.*, 2018), tanto a escala de laboratorio como real, se ha visto como la codigestión puede resolver problemas asociados con la carencia de

micronutrientes, una relación C/N incorrecta o cargas orgánicas demasiado bajas o altas. Sin embargo, antes de llevar a cabo el proceso se debe examinar la viabilidad del sustrato para codigestión, prestando una especial atención a características como la biodegradabilidad y la producción de biogás. Además, se debe determinar la proporción adecuada de cada residuo con el fin de evitar sobrecargas orgánicas en el digestor. Otras características de crítica importancia son el contenido en nitrógeno orgánico, la presencia de químicos, sulfuro, niveles de cationes, pH y alcalinidad y fósforo. La selección de productos es una etapa clave para garantizar que el proceso de codigestión anaerobia se desarrolle de forma segura y eficiente.

En la tabla 7 se muestran los valores de la relación C/N ordenados de menor a mayor para diferentes sustratos.

Tabla 7. Relación C/N de algunos sustratos (Rong Xu et al., 2018)

Sustratos	Relación C/N	Referencias
Estiércol lácteo	2,3	Zhen <i>et al.</i> (2015)
Efluente concentrado	3,0-6,6	Brown y Li (2013), Shi <i>et al.</i> (2013)
Fango	6,76-10	Silvestre <i>et al.</i> (2014); Zhang <i>et al.</i> (2014)
Lodos de aguas residuales	11,72	Alagoz <i>et al.</i> (2015)
Estiércol de pollo	10,1	Li <i>et al.</i> (2014)
Estiércol de cerdo	7,4-12,96	Ren <i>et al.</i> (2014); Zhou <i>et al.</i> (2016)
Estiércol de vaca	5,2-16,75	Wang <i>et al.</i> (2016); Zhang <i>et al.</i> (2013)
Residuos de procesamiento de soja	12,5	Zhu <i>et al.</i> (2014)
Residuos de frutas y hortalizas	18,88	Ros <i>et al.</i> (2017)
Residuos alimenticios	11,5-34	Capson-Tojo <i>et al.</i> (2017); Gou <i>et al.</i> (2014)
Residuos de grasa	39	Silvestre <i>et al.</i> (2014)
Orujo de oliva	36,61	Alagoz <i>et al.</i> (2015); Riggio <i>et al.</i> (2015)
Desechos de jardín	55,3	Brown y Li (2013)
Paja del maíz	43,3-52,41	Wang <i>et al.</i> (2016)
Rastrojo de maíz	63,2-79,7	Li <i>et al.</i> (2014); Yong <i>et al.</i> (2015)
Paja del arroz	125	Zhou <i>et al.</i> (2016)
Residuos de la yuca	152	Ren <i>et al.</i> (2014)

La codigestión puede mejorar el rendimiento del proceso principalmente debido a los siguientes motivos:

1. Equilibrar la relación C:N y añadir suficientes macro y micronutrientes (Wang *et al.*, 2012).
2. Mejorar la capacidad tamponante (Xie *et al.*, 2011).
3. Aumentar la fracción orgánica fácilmente biodegradable (Astals *et al.*, 2014).
4. Diluir sustancias tóxicas.
5. Ajustar la humedad.

Esto hace que haya cambios en la comunidad microbiológica y mejoren los efectos sinérgicos de las bacterias fermentativas y metanogénicas, aumentando la producción de biogás.

Debido a la baja concentración de materia orgánica y sólidos volátiles del fango mixto originado en una EDAR, el digestor generalmente opera a bajas cargas orgánicas. Esto ha hecho que cada vez más procesos de codigestión sean incorporados en los digestores de las EDAR utilizando sustratos biodegradables que mejoren el rendimiento energético y la función medioambiental de los digestores.

La adición de sustratos adecuados asegura una mejor estabilidad del proceso manteniendo casi constante el contenido en sólidos volátiles y evitando el aumento de sustancias fácilmente degradables que podrían conducir a la acidificación del medio y, por lo tanto, a la inhibición de las bacterias. Desafortunadamente, la mayoría de las veces es difícil garantizar la disponibilidad de cantidades adecuadas de otros tipos de sustratos para la codigestión.

Los productos aptos para su codigestión anaerobia con lodos de EDAR deben cumplir como mínimo los siguientes requisitos:

- Formato líquido para reducir costes de inversión y problemas de operación.
- Productos de origen agrícola, alimentario y/o industrial con una elevada concentración de materia orgánica ($DQO > 200.000 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) fácilmente biodegradable. Además, según la legislación, existen restricciones en el uso de algunos productos en los procesos de codigestión. Por ejemplo, en la comunidad Valenciana no se pueden utilizar los subproductos de origen animal no destinados a consumo humano (SANDACH) en los procesos de codigestión de los digestores anaerobios de EDAR.
- No tóxicos para el proceso de codigestión anaeróbica.
- Baja concentración de nitrógeno y fósforo.
- Baja concentración de materia no biodegradable en el proceso de codigestión anaerobia, con el fin de no incrementar la producción de lodos de la EDAR.
- Volumen suficiente de producto para garantizar la continuidad del proceso de codigestión anaerobia.
- Centro de producción del producto cercano a la EDAR.
- Ausencia de metales pesados, con el fin de no comprometer la idoneidad del fango digerido según el RD1310/1990 sobre la posible aplicación a suelo agrícola.

En este contexto, la gestión de residuos sólidos urbanos (RSU) se ha convertido en un grave problema medioambiental debido a que su generación ha crecido muy rápidamente con el crecimiento de la población y el desarrollo económico. La fracción orgánica de estos RSU se puede transformar mediante procesos como el compostaje y la digestión anaerobia en nuevos productos que pueden ser usados como fertilizantes y acondicionadores del suelo. El compostaje es un proceso que consume energía (alrededor de 30-35 kWh/ton residuo) mientras que la digestión anaerobia es un proceso que genera energía (100-150 kWh/ton residuo). Algunos estudios apuntan a que la digestión de estos residuos solos podría conducir a una acumulación de ácidos grasos volátiles, especialmente a altas OLR, produciendo la inhibición de la metanogénesis y la desestabilización del proceso (El-Mashad *et al.*, 2008). Por ello, numerosas investigaciones se han hecho en la codigestión de estos residuos con fango anaerobio como una alternativa y han sido implantados en muchas plantas de tratamiento de aguas residuales de todo el mundo (Fountoulakis *et al.*, 2010; Cabbai *et al.*, 2013; Nielfa *et al.*, 2015; Pitk *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Según un estudio, la codigestión de la fracción orgánica de los RSU con fango en un digestor a escala real aumentó la generación de biogás de 600 m³/día a 950 m³/día (Bolzonella *et al.*, 2006). Debido a la alta degradabilidad de estos sustratos, el introducir altas cargas orgánicas (ORL) podría resultar en inhibición por amonio (Xu *et al.*, 2012).

Los residuos de frutas y hortalizas (RFH) son altamente biodegradables por lo que rápidamente son transformados por acción de las bacterias en ácidos grasos volátiles. Para evitar esta acidificación del sistema, se deben mezclar estos residuos con cosustratos con alto contenido en nitrógeno, lo que supondría una regulación natural del pH, además de una fuente de nitrógeno.

Introducir una cantidad adecuada de RFH junto con el fango en un digestor anaerobio presenta una solución apropiada para mejorar la cantidad de metano generado por unidad de sólidos volátiles introducidos, incluso si se reduce el tiempo de retención. El potencial de producción de metano depende del contenido en componentes orgánicos de los RFH siendo estos principalmente carbohidratos, proteínas y lípidos. Según Gómez *et al.*, 2006, la codigestión de fango con RFH aumentó la producción específica de biogás de 300 a 800 L/KgSSV.

En particular, el uso de sustratos con contenidos en azúcares simples por debajo del 40% asegura la estabilidad del proceso y un buen rendimiento de producción de metano.

En la tabla 8 se muestran las ventajas y desventajas de los procesos de codigestión a modo de resumen.

Tabla 8. Ventajas y desventajas de los procesos de codigestión.

Ventajas	Desventajas
Aumenta la fracción orgánica fácilmente biodegradable	Si la carga orgánica es muy elevada puede disminuir la eficacia del proceso
Mayor producción de biogás	A veces es necesario tratar el residuo para poder codigerirlo
Valorización de residuos	
Menos coste de gestión del fango digerido (menor cantidad producida)	La disponibilidad del producto
Reducción del coste de explotación de la EDAR	No todos los residuos pueden ser utilizados
Aprovecha la complementariedad de la composición de los residuos para hacer procesos más eficientes	

Aquellas actividades industriales que generen subproductos o residuos no peligrosos con elevada concentración de materia orgánica pueden realizar su tratamiento en determinadas depuradoras de la Comunidad Valenciana, siempre que dispongan de un potencial mínimo para la generación de biogás en los digestores anaerobios de éstas. Además, las EDAR deben estar inscritas como gestores de residuos, lo cual supone ciertos trámites administrativos. Todas las

descargas directas de subproductos de origen industrial que se efectúen en cualquiera de estas EDAR deberán obtener previamente la correspondiente autorización de la Entidad de Saneamiento de Aguas (EPSAR).

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es estudiar las poblaciones microbianas presentes en tres digestores anaerobios de tres EDAR diferentes y evaluar su relación con los parámetros operacionales.

Los digestores pertenecen a tres EDAR de la provincia de Valencia, y son los siguientes: Quart-Benàger, Gandía-La Safor y Ontinyent. Todos operan en condiciones mesofílicas, pero a diferentes tiempos de retención celular y los dos primeros son alimentados con cosustratos de composiciones diferentes. Este trabajo se enmarca en un convenio con la Cátedra de Aguas de Valencia, lo que ha facilitado la adquisición de las muestras.

Para conseguir el objetivo principal se han desarrollado una serie de objetivos específicos:

- Seleccionar períodos de funcionamiento de los digestores que sean representativos y comparables entre sí para posteriormente relacionar los parámetros operacionales con los resultados microbiológicos.
- Detectar los microorganismos de interés mediante la técnica FISH.
- Cuantificar los microorganismos detectados por FISH mediante la aplicación de técnicas de análisis de imagen empleando el *software* Matlab.
- Estudiar las relaciones existentes entre los parámetros operacionales y fisicoquímicos de los digestores y la abundancia de los microorganismos identificados.
- Aplicar diversas técnicas estadísticas para el análisis e interpretación de los datos obtenidos mediante la microbiología y su posible relación con los parámetros operacionales.
- Comparar los rendimientos de los tres digestores entre sí en función de los parámetros de operación y los cosustratos añadidos.

3. Materiales y métodos

3.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras del digestor anaerobio durante un año en la EDAR de Quart-Benàger y durante cuatro meses en las de Gandía-La Safor y Ontinyent. El muestreo se realizó por parte de Aguas de Valencia siempre en el mismo punto de cada digestor utilizando para ello un recipiente de plástico. Las muestras correctamente conservadas para evitar alteraciones en su composición posteriormente eran enviadas al laboratorio de la ETSE-UV para su fijación antes de 24 horas.

Las muestras disponibles de la EDAR Quart-Benàger abarcan el período de abril de 2017 a abril de 2018 mientras que las de Gandía y Ontinyent son de febrero a mayo de 2018, debido a que estas últimas EDAR no disponían de muestras fijadas del periodo previo al comienzo del estudio.

A continuación, en la tabla 9 se muestran las fechas de muestreo de las muestras disponibles para cada digestor.

Tabla 9. Fechas de muestreo en las tres EDAR.

EDAR Quart-Benàger	EDAR Gandía-La Safor	EDAR Ontinyent
03/04/2017	08/02/2018	08/02/2018
08/05/2017	21/02/2018	21/02/2018
23/06/2017	08/03/2018	08/03/2018
16/08/2017	27/3/2018	21/03/2018
06/09/2017	18/04/2018	18/04/2018
21/10/2017	2/05/2018	2/05/2018
30/01/2018		
28/02/2018		
20/03/2018		
24/04/2018		

La EDAR de Gandía-La Safor trata un caudal de 36427 m³/día y da servicio a una población de 118192 habitantes equivalentes (he) con un rendimiento de eliminación de sólidos suspendidos del 95%, de DBO₅ del 96% y de DQO del 90%. La línea de fangos contiene un único digestor anaerobio de 7500 m³.

Sirve a los siguientes municipios de Almoines, Beniflá, Gandía, L'Alqueria de la Comtessa, Piles, Real de Gandia, Bellreguard, Benirredrà. Guardamar de la Safor, Miramar, Potríes, Villalonga, Beniarjó, Daimús, La Font d'En Carròs, Palmera y Rafelcofer.

En la figura 8 se puede observar el diagrama de bloques del proceso.

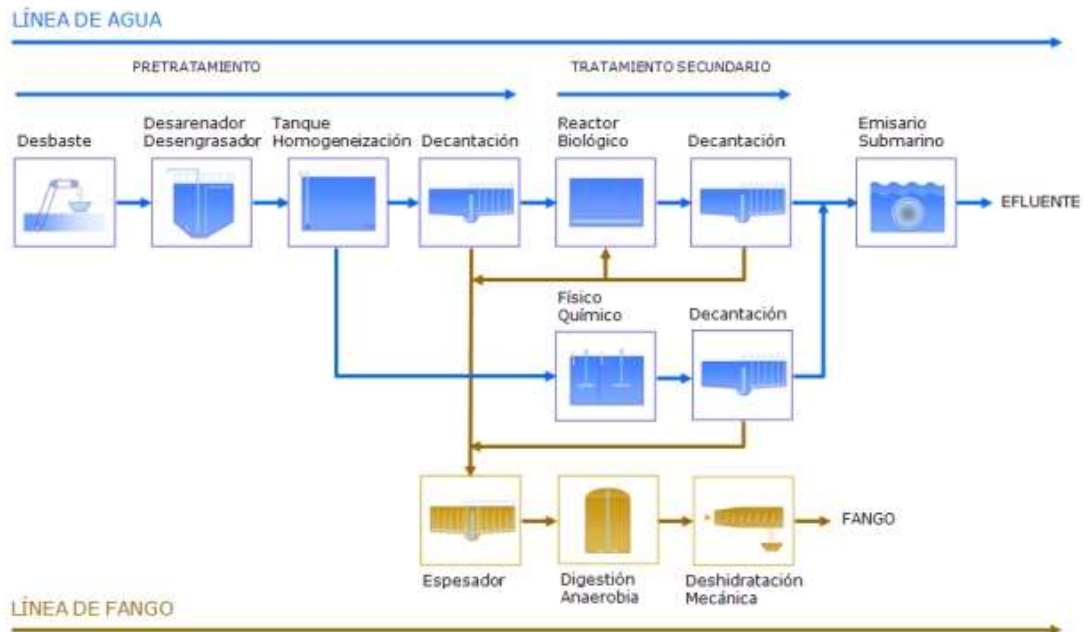


Figura 8. Diagrama de bloques de proceso de la EDAR de Gandía-La Safor. Fuente: EPSAR.

Por su parte, la EDAR de Ontinyent trata 23718 m³/día de agua residual y ofrece servicio a una población de 81340 he con un rendimiento de eliminación de sólidos suspendidos del 94%, de 95% de DBO₅ y de 92% de DQO. Sirve a los municipios de Ontinyent y Agullent. En la figura 9 se recoge el diagrama de bloques del proceso. Consta de dos digestores, pero solo uno se encuentra en funcionamiento, con un volumen de 2380 m³.

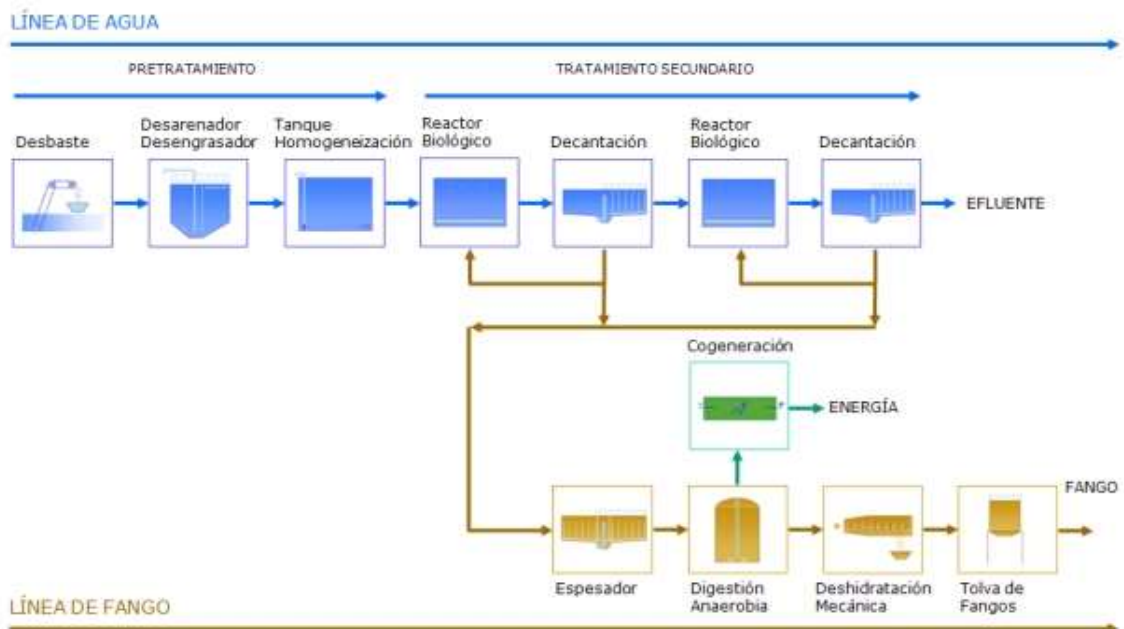


Figura 9. Diagrama de bloques de proceso de la EDAR Ontinyent-Agullent.

Por otro lado, la EDAR de Quart-Benàger trata un caudal medio de 30318 m³/día y sirve a una población de 164171 he con un rendimiento del 99% de eliminación de sólidos suspendidos, 97% de DBO₅ y 96% de DQO. Sirve a los siguientes municipios: Alaquàs, Aldaia, Manises, Mislata, Quart de Poblet y Xirivella. La figura 10 muestra el diagrama de bloques del proceso para esta EDAR.

Esta planta cuenta con un sistema de fangos activos de mezcla completa con eliminación de nitrógeno mediante aireación intermitente. La línea de fangos consta de un total de tres digestores anaerobios conectados en paralelo de 35,5 m de diámetro y 6504 m³ de volumen unitario. De estos, actualmente, solo se encuentran en funcionamiento dos.

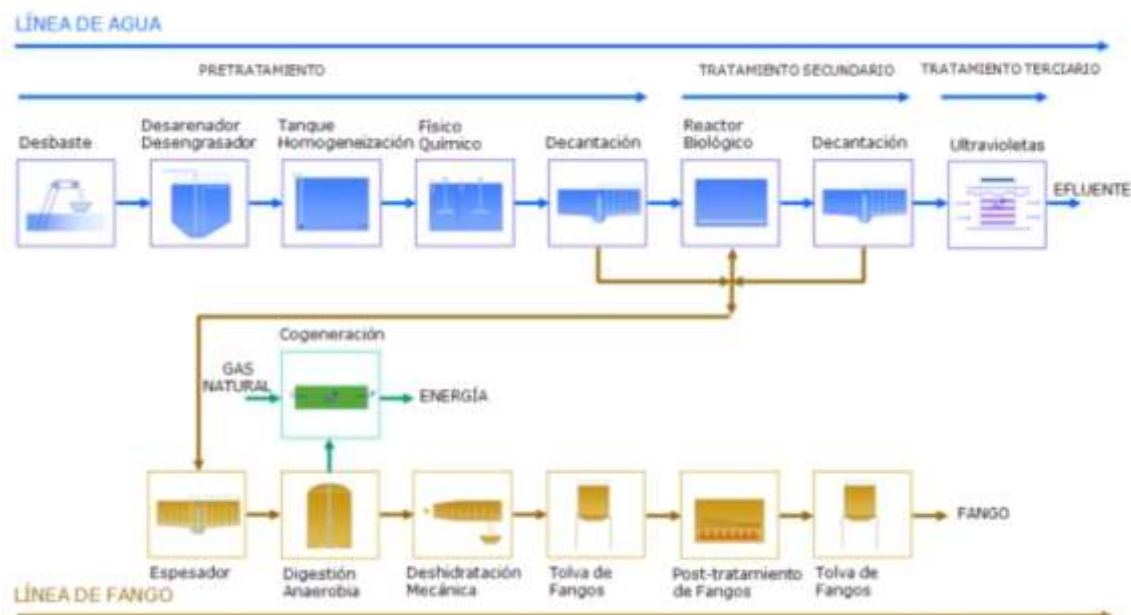


Figura 10. Diagrama de bloques de proceso de la EDAR Quart-Benàger.

A continuación, en la tabla 10 se muestra una comparación de las principales características de cada EDAR.

Tabla 10. Comparación entre los tres digestores estudiados.

	Quart-Benàger	Gandía-La Safor	Ontinyent
Caudal de tratamiento EDAR (m³/día)	30318	36427	23718
Volumen unitario de digestor (m³)	6504	7500	2380
Disposición digestores	2 digestores en paralelo	1 digestor	1 digestor
Rango TRC (días)	30-45	28-32	34-36
Rango de temperatura mesofílico (°C)	33-43	30-34	32-38
Tipo de cosustrato	Mezcla de residuos de distinta naturaleza (*)	Triturado de naranja	No se añade
Carga cosustrato (Kg DQO/Kg SSV·día)	0,015-0,143	0,001-0,021	0

(*) En la tabla 33 del anexo se recoge la actividad que realizan las empresas de las que proceden los cosustratos y la naturaleza de éstos.

3.2. Parámetros fisicoquímicos y operacionales de los digestores

Los parámetros operacionales y fisicoquímicos afectan a los microorganismos en cierta forma. Actualmente, no se tiene un claro conocimiento de cómo afectan, pero controlando y monitorizando estos parámetros, se puede mejorar el rendimiento de los digestores anaerobios.

Por parte de la empresa Aguas de Valencia fueron facilitados los parámetros fisicoquímicos y operacionales que habían sido medidos en los digestores durante los períodos del estudio. Solo algunos datos de los digestores estaban disponibles, pero otros como, por ejemplo, la DQO afluente a los digestores, no. Se tiene información acerca del porcentaje anual que supone la DQO aportada por el cosustrato en relación con la del fango. A continuación, en las tablas 11, 12 y 13 se muestran los valores medios de los parámetros fisicoquímicos en el digestor de QB, Gandía y Ontinyent respectivamente. Los valores medios mostrados en la tabla 11 para el digestor de QB se han obtenido a partir de los valores de los parámetros fisicoquímicos medidos hasta 20 días antes de la fecha de la muestra, ya que estos parámetros se miden diariamente en este digestor. En cambio, los mostrados en las tablas 12 y 13 son valores medios para cada uno de los períodos (meses) en los que se tomaron las muestras analizadas y dichos valores fueron cedidos por Aguas de Valencia.

Según el digestor, estos datos eran diarios o mensuales, pero en el caso del tiempo de retención celular, temperatura y producción de biogás de los tres digestores fueron facilitados como datos promedios mensuales.

Del proceso de digestión anaerobia llevado a cabo en la EDAR de Quart-Benàger (a partir de ahora QB) se facilitaron datos diarios de pH, conductividad, % de sequedad y % de volátiles para el fango sin digerir y digerido. Además, para el fango digerido también se tiene la DQO, concentración de ácidos grasos volátiles, alcalinidad y la composición del biogás. No fueron aportados datos de la DQO del fango, pero se sabe que el 12,8% de la DQO que entra es debida a los cosustratos y el 87,2% a los fangos mixtos.

En lo que respecta al digestor de Gandía, fueron proporcionados datos promedios mensuales del pH, ácidos grasos volátiles, alcalinidad, sólidos suspendidos totales y % de materia volátil del fango digerido (Tabla 12). Al igual que en el digestor de QB, tampoco se conoce la DQO de entrada, pero se sabe que el 6,2% de esa DQO corresponde a cosustrato.

Por último, del digestor de Ontinyent se tiene la carga de sólidos totales y de sólidos volátiles, el porcentaje de materia seca y volátil de entrada, el % de reducción de materia volátil y el pH, ácidos grasos volátiles y alcalinidad del fango digerido como datos mensuales (Tabla 13).

En cuanto a los cosustratos utilizados, se tienen datos diarios del volumen añadido y de la DQO que aportan. En los períodos estudiados, se añadieron cosustratos al digestor de QB y de Gandía, pero no al de Ontinyent. En el primero, los cosustratos son de diversa procedencia (Tabla 33 anexo) añadiéndose varios en un mismo día, mientras que en el de Gandía solo se añade triturado de naranja.

Tabla 11. Promedio de los parámetros fisicoquímicos medidos en el digestor de QB hasta la fecha de cada muestra.

Fecha muestra	pH	AGV (mg/L)	Acidez/alcalinidad	SSV (mg/L)	DQO (mg/L)
03/04/2017	7,50	95,31	0,04	11414	18533
08/05/2017	7,60	85,22	0,04	10921	17054
23/06/2017	7,45	82,55	0,04	12129	16940
16/08/2017	7,45	71,40	0,03	11630	18420
06/09/2017	7,60	64,02	0,03	13161	20316
21/10/2017	7,42	70,88	0,03	13656	20566
30/01/2018	7,36	83,50	0,04	12936	18666
28/02/2018	7,38	78,80	0,04	11397	17725
20/03/2018	7,45	63,33	0,04	11480	16200
24/04/2018	7,35	84,25	0,05	10356	15866

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos medidos en el digestor de Gandía.

Fecha	pH	AGV (mg/L)	Alcalinidad (mg/L)	Acidez/alcalinidad	SST (mg/L)	SSV (%)
enero-18	6,90	187	2371	0,08	17340	69
febrero-18	6,90	135	2028	0,07	15540	69
marzo-18	6,90	129	2025	0,06	17236	70
abril-18	6,90	131	2382	0,05	18100	71
may-18	6,90	178	2369	0,08	17480	71

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos medidos en el digestor de Ontinyent.

Fecha	pH	AGV (mg/L)	Alcalinidad (mg/L)	Acidez/alcalinidad	% Reducción de MV
enero-18	7,97	166	2044	0,08	37,8
febrero-18	7,18	149	3708	0,04	37
marzo-18	7,29	155	3475	0,04	38,4
abril-18	7,27	170	3478	0,05	31,8
mayo-18	7,35	120	3221	0,04	35,5

A continuación, en las tablas 14, 15 y 16 se muestran los parámetros operacionales de cada digestor en los periodos estudiados, así como el biogás producido y su contenido en metano (CH₄). El biogás generado está expresado en m³ de biogás por Kg de sólidos suspendidos volátiles destruidos o eliminados. En el caso del digestor de Ontinyent, se facilitó en otras unidades, m³/mes, y éstas fueron transformadas a las mismas unidades para permitir hacer un estudio comparativo. La carga de cosustrato diaria es un valor medio que se ha calculado a partir de la DQO aportada por los cosustratos diariamente durante 20 días anteriores a la toma de muestra del digestor y la concentración de sólidos suspendidos volátiles presente en el digestor. En el digestor de Ontinyent no se realiza codigestión en los periodos estudiados. Además, tampoco se conoce la DQO del fango de entrada.

Tabla 14. Parámetros operacionales y rendimiento del digestor de la EDAR de QB en los periodos estudiados.

Período	Tiempo de retención celular, TRC (días)	Temperatura (°C)	Carga cosustrato (Kg DQO/Kg SSV·día)	Biogás (m ³ /Kg SSV eliminados)	% CH ₄
abr-17	30	37,7	0,016	1,21	64,2
may-17	40	39	0,021	1,08	63,8
jun-17	42	39,8	0,017	0,98	64,4
ago-17	45	40,4	0,015	1,06	66,2
sep-17	41	42,9	0,018	1,06	67,4
oct-17	39	40,5	0,053	0,95	65,4
ene-18	31	37,9	0,095	0,98	61,0
feb-18	35	36,8	0,024	1,02	59,7
mar-18	30	34,5	0,025	0,84	64
abr-18	30	33,4	0,016	0,87	64

Tabla 15. Parámetros operacionales y rendimiento del digestor de la EDAR de Gandía en los periodos estudiados.

Período	TRC (días)	Temperatura (°C)	Carga cosustrato (Kg DQO/ Kg SSV·día)	Biogás (m ³ /Kg SSV eliminados)	% CH ₄
enero-18	31	34	0,013	0,87	61
febrero-18	28	33	0,011	0,69	61
marzo-18	30	32	0,00009	0,88	61
abril-18	32	30	0,005	0,66	61
may-18	30	30	0,001	0,77	61

Tabla 16. Parámetros operacionales y rendimiento del digestor de la EDAR de Ontinyent en los periodos estudiados.

Período	TRC (días)	Temperatura (°C)	Carga de SSV (Kg SSV/m ³ ·día)	Biogás (m ³ /Kg SSV eliminados)	% CH ₄
enero-18	34	38	0,76	1,01	66
febrero-18	31	37	0,77	0,84	67
marzo-18	36	38	0,76	0,84	66
abril-18	36	32	0,72	0,58	66
mayo-18	22	35	1,16	0,86	66

3.3. Hibridación fluorescente in situ (FISH)

3.3.1. Reactivos

Paraformaldehído

Utilizado para paralizar la actividad celular de las bacterias Gram negativas presentes en las muestras estudiadas.

Calentar 65 ml de agua bidestilada hasta 60°C. Añadir 4 g de Paraformaldehído (PFA). Añadir 1 gota de una solución de NaOH 2M y agitar rápidamente hasta que la solución se haya clarificado. Quitar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X. Ajustar el pH a 7,2 con HCl. Eliminar cualquier resto de cristales por filtración a través de 0,2-0,45 µm. Enfriar rápidamente a 4°C y conservar a esta temperatura. Alicuotar 800 µL en tubos de 1,5 ml y conservar a -20°C.

TRIS-HCl 1M pH 8 (tampón de hibridación y tampón de lavado)

Mantiene el pH neutro en el proceso de hibridación, ya que éste es sensible a los cambios de concentración y temperatura.

Pesar 121,1 g de Tris base [tris(hidroximetil)aminometano] y disolver en 800 ml de agua destilada. Añadir 42 ml de HCl concentrado y enrasar hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Filtrar con 0,45 µm un volumen de 50 ml y guardar a temperatura ambiente en tubos Falcon.

NaCl 5M

El Na⁺ neutraliza la carga negativa en la cadena de ácidos nucleicos, facilitando la formación del híbrido ADN/ARN.

Pesar 292,2 g de NaCl y disolver en 800 ml de agua destilada. Enrasar con agua destilada hasta un volumen de 1000 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y posteriormente filtrar con 0,45 µm un volumen de 50 ml y guardar a temperatura ambiente en tubos Falcon.

EDTA 0,5 M

Es un quelante de los cationes metálicos.

Pesar 186,1 g de EDTA y añadir 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con NaOH para ayudar a disolver el EDTA. Completar hasta 1000ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y posteriormente filtrar.

SDS 10% (tampón hibridación y tampón de lavado)

Ayuda a romper la pared celular, mejorando la penetración de la sonda. También contribuye a mejorar la accesibilidad sobre la diana desnaturalizando o eliminando las proteínas.

Pesar 10 g de SDS y llevar hasta 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Soluciones de Etanol al 50, 80 y 98%

Se emplean para deshidratar las muestras fijadas sobre los pocillos ya que el agua podría disminuir la resolución durante la microscopía.

Preparar cada solución a partir de etanol absoluto grado PRS en un volumen final de 40-50 ml y conservarlas en tubos Falcon.

Solución de gelatina para preparación de portaobjetos

Se debe gelatinizar la superficie del portaobjetos sobre el que se coloca la muestra a analizar para conseguir una mejor adherencia de ésta y reducir la pérdida de microorganismos durante las posteriores fases del proceso.

Pesar 0,1 g de gelatina y 0,01 g de sulfato potásico cromato y disolver en 100 ml de agua destilada a 60°C. Una vez disuelta, dejar enfriar a 50°C. Sumergir durante 2-3 segundos cada porta y dejar secar en posición vertical *overnight*.

Tampón fosfato salino (PBS 3x)

Para 1L: disolver en primer lugar los fosfatos y después el cloruro sódico: 22,8 g de NaCl, 3 g de NaH_2PO_4 , 2,88 g de Na_2HPO_4 . Enrasar hasta 1000 ml con agua destilada y ajustar a pH 7,4. Esterilizar por filtración con diámetro 0,20-0,45 μm . Conservar a 4°C en tubos Falcon de 50 ml.

3.3.2. Equipos y materiales necesarios

Tanto para la preparación de los reactivos como de las muestras, así como para el proceso de hibridación son necesarios una serie de equipos y materiales que se nombran a continuación:

- Baño de agua con temperatura regulable.
- Estufa de hibridación (46°C).
- Microscopio de epifluorescencia Leica DM 2500 con cámara Leica DFC 420C.
- Líquido de montaje Marca Vectashield (Vector Laboratories, USA).
- Portaobjetos de vidrio cubiertos con teflón con 10 pocillos.
- Cubreobjetos.
- Aceite de inmersión.
- Centrífuga.
- Agua milliQ.
- Agua destilada.
- Tubos falcon de 50 ml.
- Tubos eppendorf de distintas capacidades.
- Micropipetas automáticas.
- Material volumétrico de vidrio.
- Pipetas pasteur de plástico.
- Balanza de precisión.

3.3.3. Protocolo de FISH

El protocolo a seguir para la identificación de los microorganismos mediante FISH es el siguiente:

- Fijación de las muestras

Para estudiar la microbiología presente en el momento en el que se coge la muestra, es necesario paralizar la actividad celular para que los microorganismos no sigan proliferando fuera del digestor en otras condiciones. Para ello, las muestras fueron fijadas siguiendo el protocolo

especificado más abajo, antes de 24 horas tras la toma de muestras. Posteriormente, se conservaron a -20°C hasta que se procedió a su análisis por la técnica FISH.

Los pasos seguidos para la fijación de las bacterias Gram negativas usando Paraformaldehído (PFA) se describen a continuación:

- Añadir 3 volúmenes de PFA (750 µl) a 1 volumen de muestra (250 µl) y mantener a 4°C durante 1-3 horas.
- Centrifugar durante 3 min a 7000 rpm (5000 x g) para concentrar las células y posteriormente, eliminar el paraformaldehído que ha quedado como sobrenadante.
- Resuspender (lavar) en PBS 1x.
- Repetir los 2 últimos pasos.
- Centrifugar de nuevo, eliminar el sobrenadante y resuspender al 50% de etanol.
- Guardar a -20 °C.

Por otro lado, los pasos seguidos para la fijación de las bacterias Gram positivas son:

- Añadir 1 volumen de etanol absoluto (500 µl) a 1 volumen de muestra (250 µl muestra + 250 µl de PBS) y mantener a 4°C durante 3 horas.
- Centrifugar durante 3 min a 7000 rpm (5000 x g) para concentrar las células y posteriormente, eliminar el sobrenadante.
- Resuspender (lavar) en PBS 1X.
- Repetir los 2 últimos pasos.
- Centrifugar de nuevo y eliminar el sobrenadante y resuspender al 50% de etanol (500 µl etanol y 500 µl PBS).
- Guardar a -20 °C.

- **Preparación de los portaobjetos (gelatinizar)**

Con el fin de mejorar la adhesión de la muestra durante el tratamiento y obtener una distribución homogénea de ella sobre los pocillos, se recomienda usar portaobjetos previamente tratados con una solución de gelatina.

Para ello, lavar los portaobjetos sumergiéndolos durante 15 min en un recipiente con agua y detergente. Luego enjuagarlos con agua destilada y dejarlos secar al aire. Mantener la solución de gelatina a 50°C y sumergir los portaobjetos, una vez secos, durante unos 3 segundos para cubrirlos con la gelatina. Posteriormente, dejar secar los portaobjetos al aire en posición vertical durante 1 día.

- **Inmovilización de la muestra sobre el portaobjetos**

Colocar un volumen de 8 µl de muestra fijada en cada pocillo del portaobjetos previamente gelatinizado y posteriormente meter en la estufa a 46 °C durante unos 10 minutos hasta que estén completamente secos. El secado a esa temperatura mejora la adhesión de la muestra al pocillo.

- **Deshidratación**

La deshidratación de las muestras inmovilizadas elimina el agua de éstas para aumentar la resolución durante la microscopía. Para ello se sumerge el portaobjetos en una batería de etanol

al 50, 80 y 98% durante 3 min en cada disolución. Posteriormente, dejar secar al aire antes de seguir con el siguiente paso. Después de este procedimiento, el portaobjetos con las muestras deshidratadas puede ser almacenado indefinidamente a -20°C hasta que se proceda al proceso de hibridación.

- Preparación de las sondas

Las sondas adquiridas comercialmente están liofilizadas y tienen que ser resuspendidas en TE buffer. Para poder utilizarlas en FISH, se deben preparar a la concentración de trabajo de 50 µg/ml, partiendo de la concentración de stock. Para ello son diluidas con la cantidad necesaria de agua milliQ y son almacenadas en pequeños tubos, unos 80 µl, a -20°C.

- Hibridación

Preparar la solución de hibridación en un tubo de 2000 µl. Según el porcentaje de formamida necesario, en la tabla 17, se recoge la cantidad a añadir de formamida y de agua milliQ. Además, se deben añadir 360 µl de NaCl 5M, 40 µl de Tris/HCl 1M y 2 µl de SDS al 10%. La formamida debe de ser manipulada en campana extractora ya es que muy tóxica.

Cada portaobjetos consta de 10 pocillos. Por cada pocillo que vaya a contener muestra a hibridar, añadir 1 µl de cada sonda (general y específica) y 8 µl de solución de hibridación. El portaobjetos se mete en la cámara de hibridación donde se mantiene en un ambiente con formamida. Realizar este paso lo más rápidamente posible para evitar la pérdida de fluorescencia de las sondas por la posible exposición a la luz. Incubar a 46°C durante 1 hora.

Mientras transcurre el tiempo de incubación, preparar la solución de lavado en un tubo falcon de 50 ml según % de formamida (Tabla 18). Además, este debe contener 1 ml de Tris/HCl, 50 µl de SDS y agua milliQ hasta un volumen de 50 ml. Una vez preparada, atemperar en baño a 48°C.

Sacar el portaobjetos de la estufa evitando el contacto con luz directa, lavar con solución de lavado e introducir en la solución de lavado a 48°C. Mantenerlo así durante 10-15 minutos. La solución de lavado elimina el exceso de sonda sin comprometer la hibridación y manteniendo condiciones similares a las de hibridación. Por último, lavar con agua MilliQ y dejar secar en oscuridad. Una vez seco, el portaobjetos se puede conservar a -20°C.

Tabla 17. Preparación de la solución de hibridación según el porcentaje de formamida.

Cantidad de formamida (µl)	% Formamida en el pocillo	Cantidad de agua milli-Q
0	0	1598
100	5	1498
200	10	1398
300	15	1298
400	20	1198
500	25	1098
600	30	998
700	35	898
800	40	798
900	45	698
1000	50	598

Tabla 18. Preparación de la solución de lavado según el porcentaje de formamida.

% Formamida	NaCl (M)	μl NaCl 5M	μl EDTA 0,5M
0	0,900	9000	-
5	0,636	6300	-
10	0,450	4500	-
15	0,318	3180	-
20	0,225	2150	500
25	0,159	1490	500
30	0,112	1020	500
35	0,080	700	500
40	0,056	460	500
45	0,040	300	500
50	0,028	180	500

3.3.4. Tratamiento de muestras con lisozima

Según Meier *et al.* (1999) para mejorar la permeabilidad de la pared celular de los microorganismos objetivo de la sonda LGCmix del Phylum *Firmicutes*, se debe añadir una disolución de lisozima. Esta enzima rompe las paredes celulares de las bacterias y permite que las sondas accedan más fácilmente a los ribosomas. El procedimiento de permeabilización con lisozima partiendo de las muestras inmovilizadas deshidratadas con etanol es el siguiente:

1. Aplicar 10 μl de disolución de lisozima con una concentración de 240000 U/ml (6 mg/ml) sobre cada uno de los pocillos extendiéndola homogéneamente.
2. Colocar el portaobjetos en posición horizontal en un tubo falcon de 50 ml con papel humedecido con 2 ml de agua milliQ.
3. Incubar a 37°C durante 20 min.
4. Lavar el portaobjetos 3 veces por inmersión en agua y posteriormente una vez en etanol absoluto.
5. Dejar secar al aire.
6. Una vez seco, seguir con el protocolo de hibridación o almacenar a -20°C para su conservación durante meses.

3.4. Sondas

Las sondas utilizadas en el estudio se han comprado ya marcadas para ser directamente utilizadas en FISH siendo necesario, previamente, prepararlas a la concentración de trabajo (50 microgramos/l). En la tabla 19 se muestran las sondas empleadas en este estudio junto a su secuencia, el organismo al que va dirigida, el porcentaje de formamida, así como la referencia del artículo científico de donde se ha obtenido.

A todas las muestras se les ha aplicado la sonda específica que hibrida los microorganismos que se quieren identificar y cuantificar en cada caso y un par de sondas generales que detectan la mayoría de las bacterias del dominio eubacteria, EUBmix, y las arqueas, ARCH915.

Para la hibridación con las sondas de metanogénicas se han utilizado las muestras fijadas de gram negativa, ya que según se ha consultado en la bibliografía (Sakai *et al.*, 2008), los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales* responden a este tipo de pared celular, mientras que los microorganismos del orden *Methanosarcinales* se clasifican tanto como gram positivas como negativas. Para este último orden, se llevó a cabo una hibridación con ambos tipos de muestras fijadas y la cuantificación dio como resultado una presencia similar. Por lo tanto, para la identificación de los microorganismos metanogénicos se emplearon las muestras de gram negativas.

Los marcadores fluorescentes utilizados fueron FAM (6-carboxi-fluoresceína), el cual emite luz verde ($\lambda=520$ nm) al excitarse con luz azul ($\lambda=490$ nm) y TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina), el cual emite luz roja ($\lambda=580$ nm) al excitarse con luz verde ($\lambda=546$ nm). Las sondas generales, EUBmix y ARCH915, están marcadas con FAM y las específicas con TAMRA.

Tabla 19. Sondas empleadas en este estudio.

MIX	Sonda	Secuencia (5'->3')	Organismo	%FA	Referencia
EUBmix	EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Most Bacteria	0-50	Amman <i>et al.</i> , 1990
	EUB338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Planctomycetales</i>	0-50	Daims <i>et al.</i> , 1999
	EUB338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Verrucomicrobiales</i>	0-50	Daims <i>et al.</i> , 1999
	ARCH915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	<i>Archaea</i>	35 (20-55)	Stahl y Amann, 1991
	MSMX860	GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT	Orden <i>Methanosarcinales</i>	45	Raskin <i>et al.</i> , 1994
	MS821	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC	Some <i>Methanosarcina</i>	40	Raskin <i>et al.</i> , 1994
	MX825	TCG CAC CGT GGC CGA CAC CTA GC	<i>Methanosaeta</i>	50	Raskin <i>et al.</i> , 1994
	MB311	ACC TTG TCT CAG GTT CCA TCT CC	Orden <i>Methanobacteriales</i>	30	Crocetti <i>et al.</i> , 2006
	MG1200b	CRG ATA ATT CGG GGC ATG CTG	Orden <i>Methanomicrobiales</i>	20	Crocetti <i>et al.</i> , 2006
	MC1109	GCA ACA TAG GGC ACG GGT CT	Orden <i>Methanococcales</i>	45	Raskin <i>et al.</i> , 1994
	SRB385	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	Most <i>Desulfovibrionales</i> (most <i>delta-proteobacteria</i> sulfatoredutoras) and other Bacteria	35	Amann <i>et al.</i> , 1990

	SRB385Db	CGG CGT TGC TGC GTC AGG	<i>Desulfobacteraceae</i> (<i>Desulfobacterales</i> , <i>Desulfuromonales</i> , <i>Syntrophobacterales</i> , <i>Myxococcales</i> , and other Bacteria)	30	Rabus <i>et al.</i> , 1996
	Dtm230	TAA TGG GAC GCG GAC CCA	Many <i>Desulfotomaculum</i> <i>cluster I</i> and other <i>Firmicutes</i> (G+)	10	Hristova <i>et al.</i> , 2000
LGCmix	LGC354a	TGGAAGATTCCTACTGC	<i>Firmicutes</i> (Gram positive bacteria with low G+C content)	35	Meier <i>et al.</i> , 1999
	LGC354b	CGGAAGATTCCTACTGC	<i>Firmicutes</i> (Gram positive bacteria with low G+C content)	35	Meier <i>et al.</i> , 1999
	LGC354c	CCGAAGATTCCTACTGC	<i>Firmicutes</i> (Gram positive bacteria with low G+C content)	35	Meier <i>et al.</i> , 1999
CFXmix	GNSB-941	AAA CCA CAC GCT CCG CT	Phylum <i>Chloroflexi</i>	35	Gich <i>et al.</i> , 2001
	GNSB941-H927	GCT TGT GCG GGC CC		-	Speirs <i>et al.</i> , 2011
	GNSB941-H958	TTC TTC GYG TTG CAT CGA ATT		-	Speirs <i>et al.</i> , 2011
	CFX1223	CCA TTG TAG CGT GTG TGT MG	Phylum <i>Chloroflexi</i>	35	Bjornsson <i>et al.</i> , 2002
	CFX1223-H1206	CCC WGG AYA TAA AGG CC		-	Speirs <i>et al.</i> , 2011
	CFX1223-H1243	TTT AGC AAC YYA TTG TAC CGR		-	Speirs <i>et al.</i> , 2011
	CFB560	WCC CTT TAA ACC CAR T	Phylum <i>Bacteroidetes</i>	30	O'Sullivan <i>et al.</i> , 2002
	BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	Clase <i>Betaproteobacteria</i>	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
	HGC69a	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	Phylum <i>Actinobacteria</i>	25	Roller <i>et al.</i> , 1994
	HGC69a Compet				

Dadas las características de los diferentes órdenes de arqueas metanogénicas, el orden *Methanopyrales* no se ha incluido en el presente trabajo dado que sus miembros necesitan

rangos de temperatura óptimos para su crecimiento de 84 a 110°C (Huber y Stetter, 2001) y su presencia en digestores mesofílicos resulta imposible. En el caso del orden *Methanococcales*, el cual únicamente ha podido aislarse de ambientes con elevada salinidad (Whitman y Jeanthon, 2003), si se ha estudiado su posible presencia en el reactor a pesar de intuir su ausencia.

3.5. Observación y cuantificación

La observación de las muestras hibridadas se realizó con un microscopio de epifluorescencia Leica DM 2500 empleando como fuente de luz una lámpara de mercurio (Figura 11). En este tipo de microscopio la luz incidente es emitida desde encima de la muestra y atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo. Esta radiación es reflejada por el filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz (por fluorescencia) de una longitud de onda específica y mayor. Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación.

Los filtros utilizados en el microscopio son los mostrados en la tabla 20:

Tabla 20. Filtros utilizados en el microscopio de epifluorescencia.

Filtro	Rango de excitación	Filtro de excitación (nm)	Espejo dicróico (nm)	Filtro de emisión (nm)	Fluorocromo tinción
I3	Azul	450-490	510	515	FAM
N2.1	Verde	515-560	580	590	TAMRA

Para evitar la pérdida de fluorescencia de las moléculas, previamente a la observación al microscopio, se añadió líquido de montaje Vectashield. Es muy importante controlar la cantidad que se utiliza, ya que si se añade mucho más o menos de lo necesario se pueden obtener imágenes borrosas.



Figura 11. Microscopio de epifluorescencia.

Para cada muestra de interés, se han tomado imágenes de 20 campos elegidos al azar moviendo el portaobjetos en las dimensiones x e y, y ajustando el plano focal del microscopio en la

dimensión z. Al azar significa: No elegir los campos basándose en la presencia de microorganismos a cuantificar, esto sesgaría el análisis. Usar como criterio que el campo contenga biomasa microbiana pero no necesariamente los microorganismos a cuantificar. Fijarse en flóculos que tengan buen aspecto, no estén borrosos ni presente mucha autofluorescencia o background.

Con el objetivo de 63 aumentos, se toma una imagen del canal rojo (sonda específica) y una del canal verde (sonda general) para cada campo, por lo que habrá un total de 40 imágenes por muestra a analizar. Conviene usar una baja ampliación para capturar más biomasa como sea posible en cada imagen. Esto mejorará las estadísticas. Las células de la sonda específica aparecerán en ambos canales ocupando la misma área en ambas imágenes.

Una vez obtenidas las imágenes, para la cuantificación se ha empleado el software Matlab con el que se ha convertido la imagen en una escala de grises para posteriormente realizar una binarización diferenciando los píxeles con señal de los que no tienen señal. Esto se ha conseguido ajustando un par de parámetros que permiten regular el brillo y la señal de background.

El software genera una hoja Excel donde aparecen, en tanto por cien, los píxeles con señal en el canal rojo respecto de los píxeles con señal del canal verde, es decir, respecto al total. Además, este valor va acompañado de la desviación estándar y la incertidumbre y un gráfico de barras donde se representa el porcentaje de bacterias específicas en cada campo y una media acumulada. Estos resultados servirán para comparar la abundancia de las poblaciones de bacterias entre las diferentes muestras analizadas.

3.6. Análisis estadístico

En base a los resultados obtenidos se han utilizado diversas técnicas estadísticas para el análisis e interpretación de los datos obtenidos mediante la microbiología y su posible relación con los parámetros operacionales.

- Media aritmética

La media aritmética es el valor promedio de un conjunto de valores y es independiente de las amplitudes de los intervalos. Se calcula sumando todos los valores de la variable y dividiendo por el número de datos de esa variable (ecuación 1).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^N x_i \quad (1)$$

- Desviación estándar

La desviación estándar o desviación típica informa del grado de homogeneidad de los datos o de la dispersión que presentan respecto a la media. Se calcula mediante la ecuación 2.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

Comparando con el mismo tipo de datos, una desviación típica elevada significa que los datos están dispersos, mientras que un valor bajo indica que los valores son próximos los unos de los otros, y por lo tanto de la media.

- Varianza

La varianza de unos datos es la media aritmética del cuadrado de las desviaciones respecto a la media de esta. Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N} \quad (3)$$

Comparando con el mismo tipo de datos, una varianza elevada significa que los datos están más dispersos mientras que un valor bajo indica que los valores están por lo general más próximos a la media. Un valor de la varianza igual a cero implica que todos los valores son iguales y, por lo tanto, también coinciden con la media aritmética.

- Covarianza

La covarianza es el valor que refleja en qué cuantía dos variables aleatorias varían de forma conjunta respecto a sus medias.

La fórmula de la covarianza se expresa como sigue (4):

$$Cov(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{N} \quad (4)$$

Donde: \bar{y} es la media de la variable y, \bar{x} es la medida de la variable x.

- Coeficiente de Correlación

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. Se dice que la correlación es perfecta positiva cuando exactamente en la medida que aumenta una de ellas aumenta la otra, en cambio, la relación es perfecta negativa cuando en la medida que aumenta una variable disminuye la otra. Por lo tanto, el coeficiente de correlación de Pearson oscila entre -1 y +1 y se define por la siguiente ecuación (5), aunque comúnmente se suele utilizar el coeficiente de determinación R^2 que es simplemente el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson, evitando de esta manera los valores negativos.

$$R(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (5)$$

Donde:

x_i = valores de la variable x.

\bar{x} = media aritmética de la variable x.

y_i = valores de la variable y.

\bar{y} = media aritmética de la variable y.

En el caso de estar analizando una distribución n-dimensional con $n > 2$, podemos construir la llamada matriz de correlación. La matriz de correlación **R** es una matriz cuadrada $n \times n$ constituida por los coeficientes de correlación de cada pareja de variables, de manera que tendrá unos en su diagonal principal, y en los elementos no diagonales (i,j) los correspondientes coeficientes de correlación r_{ij} . La matriz de correlación será simétrica y puede considerarse como la matriz de varianzas entre las variables tipificadas.

$$R = \begin{pmatrix} 1 & r_{12} & \dots & r_{1n} \\ r_{21} & 1 & \dots & r_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{n1} & r_{n2} & \dots & 1 \end{pmatrix}$$

- Boxwhisker

Un diagrama de Boxwhisker, también conocido como diagrama de caja y bigotes, es un gráfico que está basado en cuartiles y mediante el cual se visualiza la distribución de un conjunto de datos. Está compuesto por un rectángulo (la «caja» o box en inglés) y dos brazos (los «bigotes» o whisker).

El gráfico suministra información sobre los valores mínimo y máximo, los cuartiles Q1, Q2 o mediana y Q3, y sobre la existencia de valores atípicos y la simetría de la distribución. Primero es necesario encontrar la mediana para luego encontrar los dos cuartiles restantes. El cuartil Q1 recoge el 25% de los datos, el Q2 constituye la mediana o el 50% de los datos y el Q3 el 75%. En la figura 12 se puede observar un diagrama de cajas y bigotes.

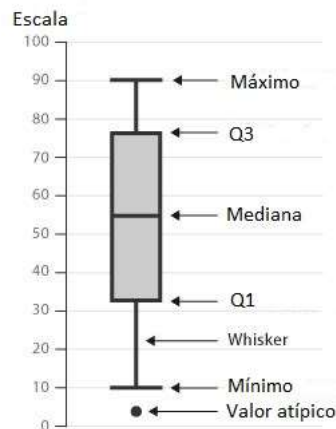


Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes.

- Análisis de componentes principales (PCA)

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica estadística multivariante cuyo objetivo es transformar un conjunto de variables originales en un nuevo conjunto de variables conocidas como componentes principales. Con esto se consigue reducirlas a un menor número facilitando el análisis posterior de las interrelaciones entre ellas, perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí. Si las variables originales están incorreladas no tiene sentido realizar un análisis de componentes principales.

Existen diferentes criterios para seleccionar el número de componentes principales:

- Gráfico de sedimentación o de “codo”: es un gráfico donde se representa los valores propios frente al número de componentes. Buscar un codo en el gráfico, es decir, un punto a partir del cual los valores propios son aproximadamente iguales.
- Criterio de la varianza explicada: seleccionar el número de componentes necesario para explicar una proporción predeterminada de la varianza, por ejemplo, el 80 o el 90%.
- Criterio del valor propio: seleccionar los componentes principales asociados a valores propios superiores a un valor prefijado, por ejemplo, la varianza media.

Como resultado se obtienen dos gráficos, el de cargas y el de puntuaciones. El gráfico de cargas muestra las relaciones existentes entre las variables e indica qué variables son responsables de los patrones observados en el gráfico de puntuaciones. Las variables que están correlacionadas positivamente están agrupadas en el mismo cuadrante mientras que las que están inversamente correlacionadas están situadas en cuadrantes opuestos diagonalmente. Por su parte, el gráfico de puntuaciones representa cómo las diferentes muestras se relacionan unas con otras, en términos de los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y operacionales del digestor.

4. Resultados

4.1. Cuantificación

Los resultados obtenidos de la cuantificación para cada una de las muestras estudiadas de cada digestor se exponen a continuación.

Muestras Quart-Benàger

En las tablas 21 y 22 se muestran los resultados cuantitativos de cada sonda aplicada para cada una de las muestras estudiadas procedentes del digestor de la EDAR de Quart-Benàger. En conjunto, los resultados de la comunidad bacteriana presentan una baja dinámica, es decir, baja variabilidad en sus abundancias relativas.

Tabla 21. Resultados de la cuantificación de bacterias hidrolíticas, acidogénicas y sulfatoreductoras en las muestras del digestor de Quart-Benàger: porcentaje de hibridación de distintos niveles taxonómicos respecto del total de bacterias y arqueas acompañado de la incertidumbre.

Muestras	Bacterias hidrolíticas y acidogénicas					Bacterias sulfatoreductoras		
	Bet42a	CFB560	LGCmix	HGC69a	CFX1223-GNSB541	SRB385Db	SRB385	Dtm230
3/4/17	1±1	0	1±1	5±1	3±1	4±1	<1	0
8/5/17	2±1	0	1±1	4±1	2±1	1±1	<1	0
23/6/17	2±1	0	1±1	2±1	1±1	1±1	<1	0
16/8/17	2±1	0	1±1	<1	1±1	2±1	<1	0
6/9/17	2±1	0	1±1	<1	1±1	<1	<1	0
21/10/17	3±1	0	1±1	<1	1±1	1±1	<1	0
30/1/18	2±1	0	1±1	3±1	3±1	2±1	<1	0
28/2/18	2±1	0	1±1	4±1	3±1	3±1	<1	0
20/3/18	3±1	0	1±1	4±1	4±1	4±1	<1	0
24/4/18	3±1	0	<1	5±1	2±1	1±1	<1	0

Tabla 22. Resultados de la cuantificación de arqueas metanogénicas de las muestras del digestor de Quart-Benàger: porcentaje de hibridación de distintos niveles taxonómicos respecto del total de bacterias y arqueas acompañado de la incertidumbre.

Muestras	MSMX860	MX825	MS821	MG1200b	MB311	MC1109
3/4/17	6±1	6±1	0	0	0	0
8/5/17	6±1	3±1	0	0	0	0
23/6/17	5±1	3±1	0	0	0	0
16/8/17	5±1	2±1	0	0	0	0
6/9/17	6±1	4±1	0	0	0	0
21/10/17	6±1	2±1	0	0	0	0
30/1/18	5±1	3±1	0	0	0	0
28/2/18	4±1	3±1	0	0	0	0
20/3/18	6±1	4±1	0	0	0	0
24/4/18	6±1	3±1	0	0	0	0

Los resultados mostrados en las tablas anteriores se representan en la figura 13. Se ha utilizado la incertidumbre como medida de dispersión en lugar de la desviación estándar para considerar el número de campos estudiados. Ésta presenta valores del 1% para la hibridación de todos los microorganismos. Para los cálculos y representaciones gráficas, las abundancias menores del 1% se han fijado en 0,5.

En general, es normal que se hayan obtenido porcentajes de hibridación tan bajos ya que en un digestor anaerobio se quiere estabilizar el fango, es decir, reducir el número de microorganismos viables, aunque al mismo tiempo son ellos los que hacen posible esa estabilización.

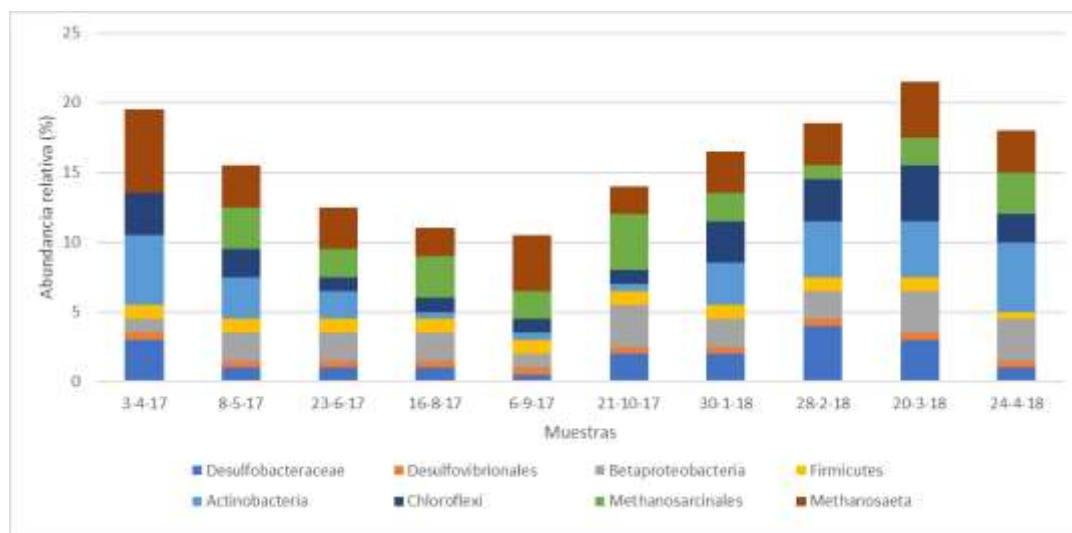


Figura 13. Abundancia relativa de la población de bacterias y arqueas en el digestor de QB. La abundancia detectada por la sonda MX825 del género *Methanosaeta* está dentro de la de la sonda MSMX860 del orden *Methanosarcinales*.

La población de bacterias detectada fue mayor que la de arqueas en todas las muestras. Se detectó presencia de los phylum *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Chloroflexi*, de la clase *Betaproteobacteria* del phylum *Proteobacteria* y de bacterias sulfatoreductoras (SRB). Debido a la gran diversidad de bacterias que existe en estos sistemas, es muy difícil identificar y cuantificar la comunidad bacteriana completa. El máximo porcentaje de bacterias obtenido tras la cuantificación ha sido de un 15,5%. Las únicas metanogénicas detectadas fueron las del orden *Methanosarcinales* siendo *Methanosaeta* el género predominante.

En cuanto a la sonda del phylum *Firmicutes* (LGCmix), se han identificado señales correspondientes a positivos muy débiles y dispersas lo que puede estar ligado a que estas bacterias tienen la pared celular muy gruesa. Esto unido a la intensa autofluorescencia que presentan las muestras ha hecho muy difícil su cuantificación mediante Matlab, por lo que se ha realizado una cuantificación de forma manual sumando aproximadamente los píxeles que corresponde a la señal de la sonda con respecto a los píxeles totales de todo el flóculo utilizando Photoshop. Así se ha calculado una abundancia del 1% de este phylum en todas las muestras excepto en la del 24/4/18 en la que se observó una presencia menor. En cuanto a su morfología, presentan agrupaciones en forma de filamentos cortos.

Por su parte, el phylum *Chloroflexi* mostró poca intensidad tras la hibridación de las muestras con las sondas CFX1223 y GNSB541. Tras ello, se revisó la bibliografía y se encontró una serie de helpers que habían sido añadidos en la hibridación para mejorar la intensidad de la señal. Se repitió la hibridación empleando las mismas sondas junto a los helpers. Dado que se tenía que emplear un total de ocho sondas por pocillo, se modificaron las cantidades añadidas. Se utilizó

0,4 µl de la sonda del dominio arquea (ARCH915), 1 µl de la sonda del dominio eubacteria (EUBmix) y 0,4 µl de cada sonda específica y helper. El resultado se muestra en la tabla 21.

En cuanto a la clase *Betaproteobacteria*, su abundancia en las muestras analizadas está entre el 1 y el 3%. En la figura 14 se muestra una imagen de un campo a 630x de las bacterias detectadas de la clase *Betaproteobacteria*.

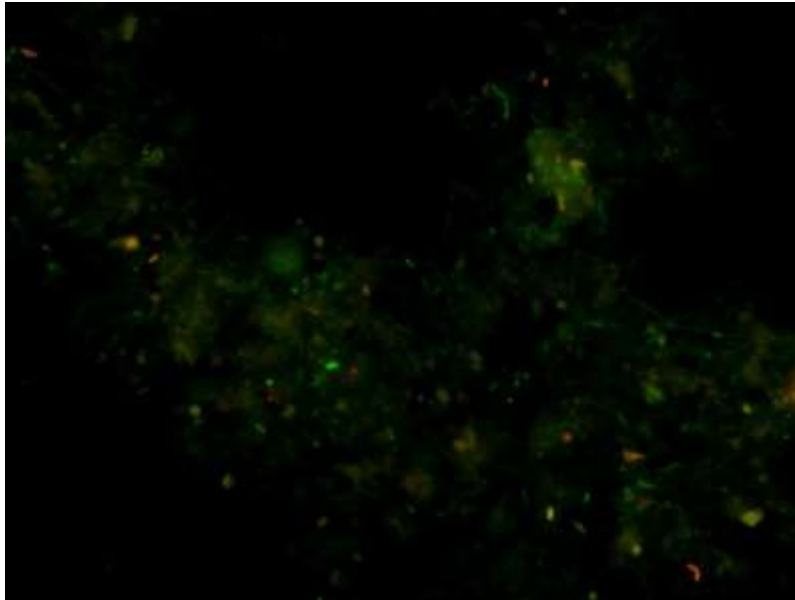


Figura 14. Bacterias de la clase *Betaproteobacteria* (imagen a 630x).

El phylum *Actinobacteria* supone uno de los grupos de bacterias más abundante identificado en las muestras analizadas. En cuanto a su morfología, la mayoría se unen formando filamentos gruesos (como cadenas de bacterias con formas rectangulares) en los que son visibles los septos celulares, que son las separaciones entre bacterias de la cadena (Figura 15). Tras consultar en la bibliografía (Nielsen *et al.*, 2009), podrían corresponder al morfotipo *Nostocoida limicola II*, el cual está cubierto por la sonda utilizada (HGC69a). En los filamentos se ven células que no emiten fluorescencia probablemente debido a que esas células estén inactivas o muertas, ya que la fluorescencia depende del contenido en ribosomas. Se han cuantificado obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 21. Su abundancia disminuye por debajo del 1% para las muestras de agosto, septiembre y octubre.

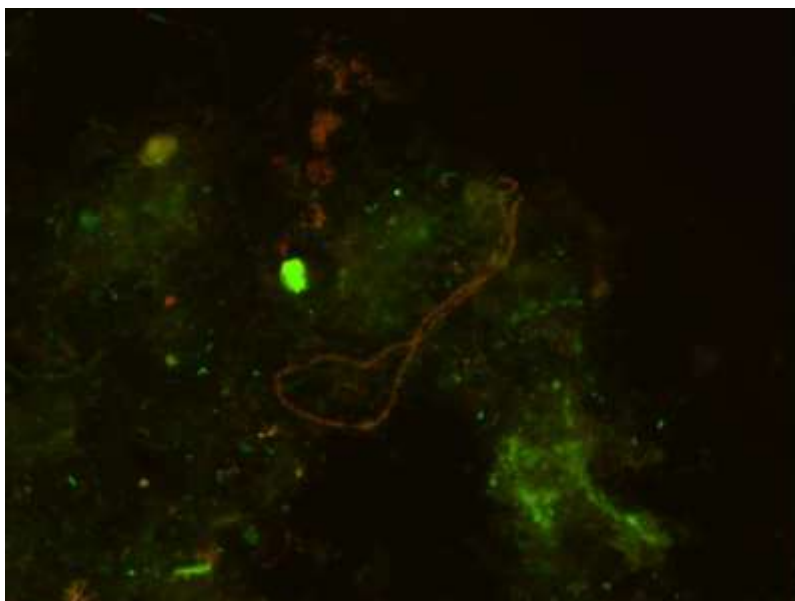


Figura 15. Bacterias del phylum Actinobacteria en el digestor anaerobio (imagen a 630x).

Para la detección de las bacterias sulfatoreductoras de la clase *Deltaproteobacteria* empleando las sondas SRB385 y SRB385Db se obtuvieron señales positivas para ambas con distinta abundancia. Con la sonda SRB385Db para las SRB de la familia *Desulfobacteraceae* (Figura 16), la señal varía entre las diferentes muestras mientras que con la sonda SRB385 para *Desulfovibrionales*, se obtuvo una abundancia menor del 1% en todas las muestras analizadas (Figura 17). Con la sonda SRB385Db se detectaron bacterias pequeñas, dispersas y muy poco floculadas (Figura 15). Los resultados se muestran en la tabla 21. Por otro lado, con la sonda Dtm230 se detecta a las SRB del género *Desulfotomaculum* pertenecientes al phylum *Firmicutes*, pero no se obtuvieron señales positivas.

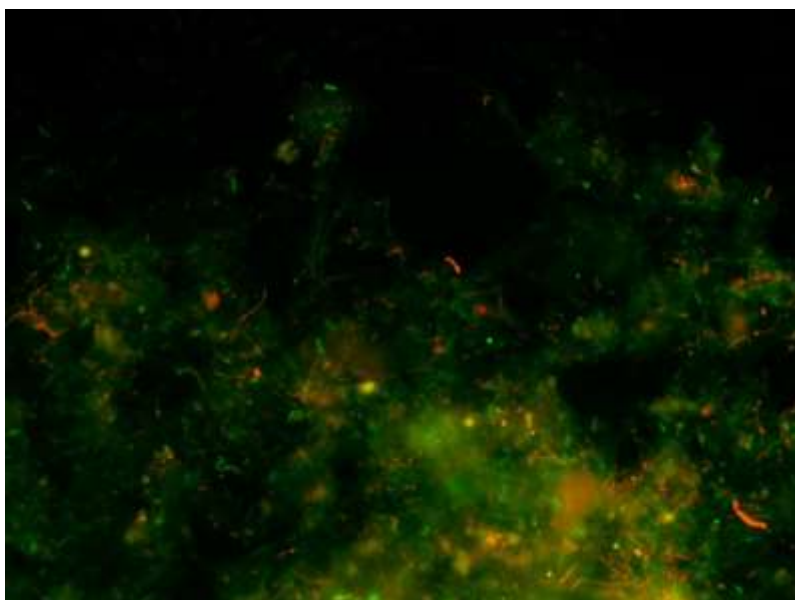


Figura 16. Bacterias sulfatoreductoras de la familia *Desulfobacteraceae* detectadas por la sonda SRB385Db (imagen a 630x).

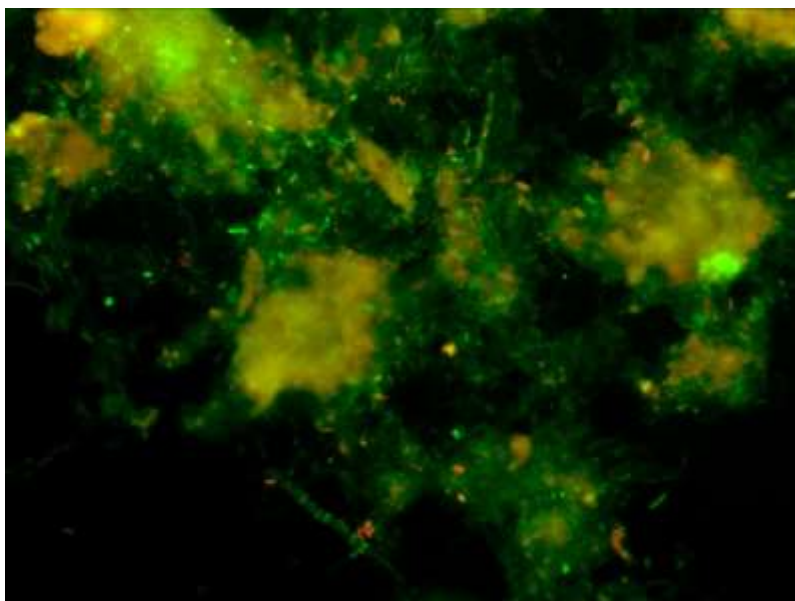


Figura 17. Bacterias sulfatoreductoras del orden Desulfovibrionales detectadas con la sonda SRB385 (imagen a 630x).

El orden *Methanosarcinales* es el más abundante en todas las muestras, estando ausentes las arqueas del orden *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*. En el caso del orden *Methanococcales*, era de esperar su ausencia en las muestras estudiadas dado que suelen crecer en ambientes con elevada salinidad (Esteves, 2014; Whitman & Jeanthon, 2003). Por debajo del orden *Methanosarcinales*, se han aplicado dos sondas a nivel de género, MS821 para *Methanosarcina* y MX825 para *Methanosaeta*. Estas arqueas metanogénicas se diferencian en cuanto a su metabolismo, ya que *Methanosarcina* es capaz de generar metano tanto por la ruta hidrogenotrófica como por la acetoclástica mientras que *Methanosaeta* solo lo hace por la acetoclástica, es decir, utiliza acetato como único sustrato. En un principio se podría esperar que abundaran *Methanosarcina* ya que estas pueden utilizar dos sustratos y *Methanosaeta* solo uno. Sin embargo, tras realizar FISH con ambas sondas, solamente la sonda MX825 de *Methanosaeta* ha dado señales positivas. Según la bibliografía (Demirel *et al.*, 2008; Nakakihara *et al.*, 2014), *Methanosaeta* compite con *Methanosarcina* a bajas concentraciones de acético.

Dado que con la sonda MSMX860 se identificaron microorganismos con morfología de barra, se esperaban que éstos fueran del género *Methanosaeta* ya que estos microorganismos presentan esta morfología (Figura 18). Los del género *Methanosarcina* detectados por la sonda MS821 son cocos, cocos irregulares o polígonos planos. Por ello, basándose en la morfología no se han identificado señales positivas del género *Methanosarcina*.

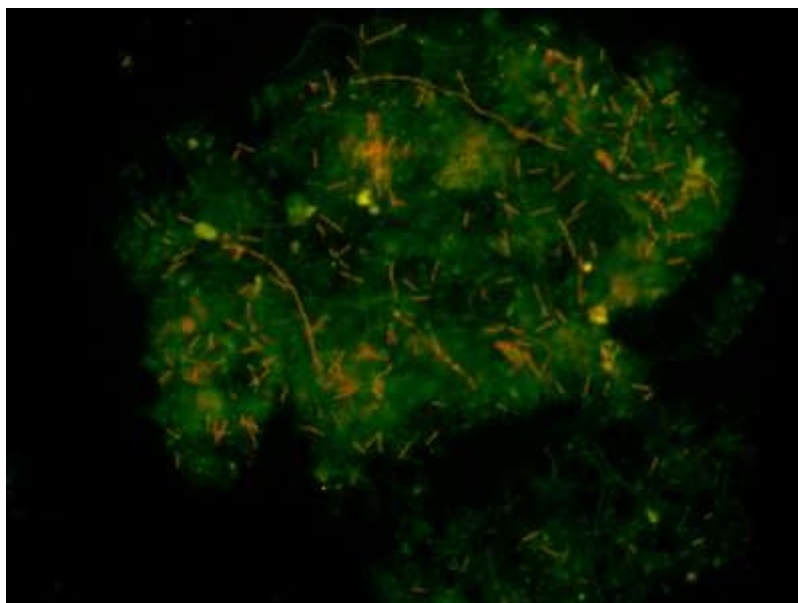


Figura 18. Arqueas metanogénicas del género *Methanosaeta* detectadas con la sonda MX825. La superposición de las sondas da el color naranja en la imagen (imagen a 630x).

Las sondas para la identificación de miembros de los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* dieron resultados ambiguos. Con ambas sondas se ven puntos muy pequeños en el canal rojo que en un principio se creyó que correspondían a señales positivas de la sonda, pero en el canal verde no se aprecian o se muestran en rojo, lo que significa que son residuos inertes de la muestra que tienen mucha fluorescencia en el canal rojo y se pasan al verde. Además, con el fin de aclarar si esos puntos eran positivos, se observaron las muestras al microscopio con el objetivo de 1000 aumentos para comprobar si se veía la morfología de estas arqueas. Sin embargo, con 1000 aumentos, los puntos pequeños seguían viéndose muy pequeños por lo que se concluyó que dichas sondas daban resultados negativos. Al observar al microscopio el pocillo del control negativo (muestra con solución de hibridación), también se ven esos puntos pequeños, pero no en tanta cantidad, por lo que desde ese punto de vista si se podría pensar que corresponden a positivos.

Muestras Gandía-La Safor

En las tablas 23 y 24 se muestran los resultados cuantitativos de cada sonda aplicada para cada una de las muestras estudiadas procedentes del digestor de la EDAR de Gandía-La Safor. Al igual que para las muestras de Quart-Benàger, los resultados de la comunidad bacteriana presentan poca variabilidad. Al observar estas muestras al microscopio, presentaban más background que las del digestor de Quart-Benàger, lo que hizo más difícil la posterior cuantificación.

Tabla 23. Resultados de la cuantificación de bacterias hidrolíticas, acidogénicas y SRB en las muestras del digestor de Gandía-La Safor: porcentaje de hibridación de distintos niveles taxonómicos respecto del total de bacterias y arqueas acompañado de la incertidumbre.

Muestras	Hidrolíticas y acidogénicas					Sulfatoreductoras		
	Bet42a	CFB560	LGCmix	HGC69a	CFX1223-GNSB541	SRB385Db	SRB385	Dtm230
8/2/18	2±1	0	0	3±1	3±1	2±1	1±1	0
21/2/18	3±1	0	0	3±1	3±1	2±1	1±1	0
8/3/18	3±1	0	0	3±1	4±1	2±1	1±1	0
27/3/18	3±1	0	0	3±1	4±1	2±1	1±1	0
18/4/18	2±1	0	0	3±1	4±1	1±1	1±1	0
2/5/18	2±1	0	0	3±1	4±1	2±1	1±1	0

Tabla 24. Resultados de la cuantificación de arqueas metanogénicas en las muestras del digestor de Gandía-La Safor: porcentaje de hibridación de distintos niveles taxonómicos respecto del total de bacterias y arqueas acompañado de la incertidumbre.

Muestras	MSMX860	MX825	MS821	MG1200b	MB311	MC1109
8/2/18	3±1	3±1	0	<1	<1	0
21/2/18	3±1	3±1	0	<1	<1	0
8/3/18	4±1	3±1	0	<1	<1	0
27/3/18	3±1	3±1	0	<1	<1	0
18/4/18	4±1	2±1	0	<1	0	0
2/5/18	4±1	3±1	0	<1	0	0

En la figura 19 se muestran los resultados de la cuantificación para las muestras analizadas del digestor de la EDAR de Gandía.

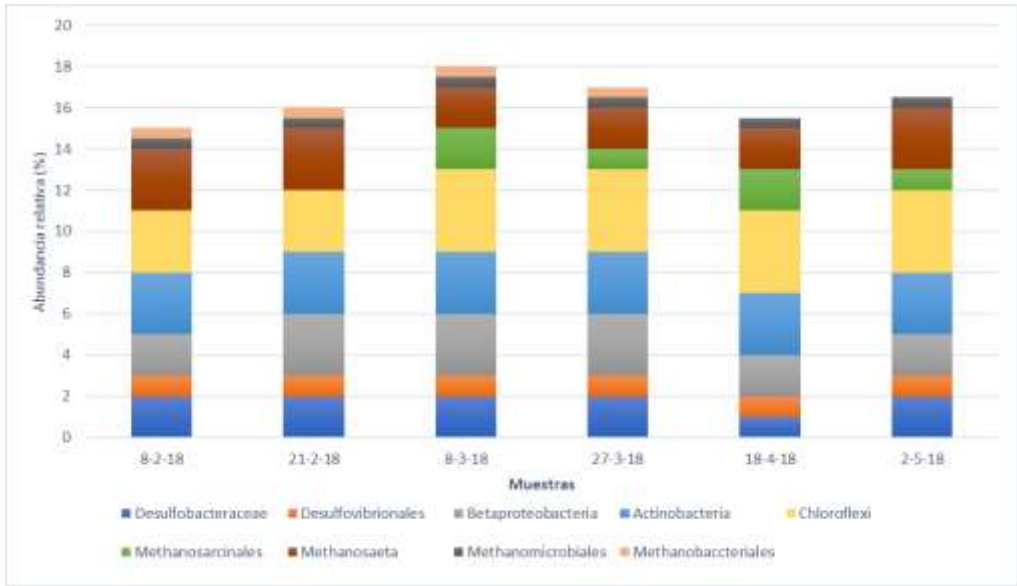


Figura 19. Abundancia relativa de la población de bacterias y arqueas en el digestor anaerobio de la EDAR de Gandía. La abundancia detectada por la sonda MX825 del género Methanosaeta está dentro de la de la sonda MSMX860 del orden Methanosarcinales.

Al aplicar la mezcla de sondas LGCmix para el phylum *Firmicutes* con las muestras previamente pretratadas con lisozima para facilitar la penetración de la sonda, no se han detectado señales positivas. Esto parece más un problema de inespecificidad de la sonda que de la no existencia de estos microorganismos ya que en estudios anteriores (Ramón Zornoza Martínez, 2015) esta sonda tampoco dio señales positivas y si lo hizo una sonda aplicada por debajo del phylum a nivel de especie, por lo que apunta a la inespecificidad de esta sonda. Además, estudios de secuenciación masiva de ADN han demostrado la presencia de *Firmicutes* en estos digestores cuando la sonda no lo ha detectado (datos sin publicar).

Por su parte, la sonda CFB560 de *Bacteroidetes* tampoco dio señal de hibridación. Las sondas Bet42a para las bacterias de la clase *Betaproteobacteria* y HGC69a para las del phylum *Actinobacteria* sí hibridaron con las bacterias objetivo. Las señales detectadas por esta última sonda fueron un poco confusas porque no estaban bien definidas y se decidió cuantificarlas con una abundancia constante. El phylum *Chloroflexi* también fue identificado con bastante abundancia.

La población de bacterias sulfatoreductoras resultó poco abundante. La sonda SRB385 mostró escasas señales positivas de hibridación que, además eran difíciles de cuantificar y no se observaron variaciones en su abundancia entre las muestras analizadas, por lo que se estimó una abundancia constante para todas ellas del 1%. Con la sonda SRB385Db se observaron más señales positivas (Figura 20), pero también se tuvieron dificultades en su cuantificación por lo que se hizo uso de Photoshop para retocar las imágenes. La sonda Dtm230 de *Desulfotomaculum* no dio señal positiva de hibridación.

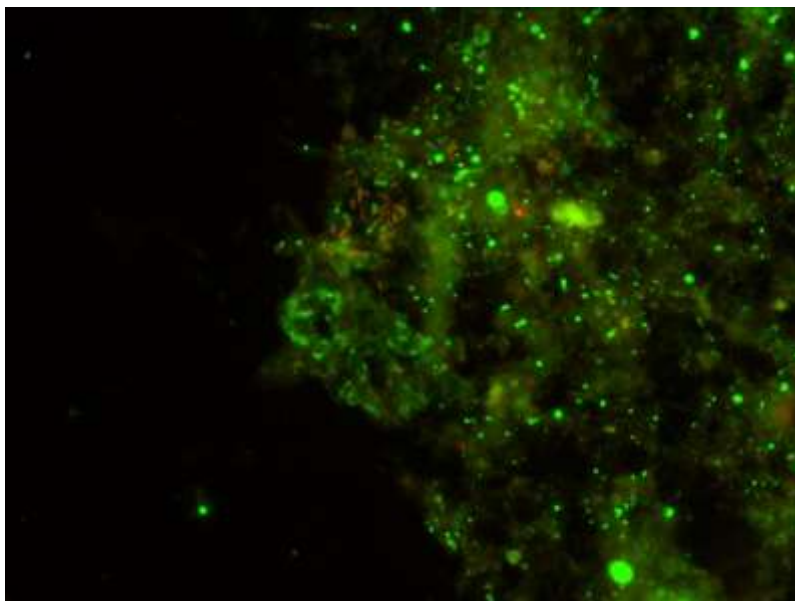


Figura 20. Bacterias sulfatoreductoras de la familia *Desulfobacteraceae* detectadas por la sonda SRB385Db (imagen a 630x).

Al igual que en el digestor de QB, el orden *Methanosarcinales* es el grupo más abundante de metanogénicas detectado (Figura 21). Dentro de este orden, el género *Methanosaeta* es el único que dio señales de hibridación. En cuanto a los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*, el porcentaje de hibridación respecto del total resultó ser menor que un 1% en la mayoría de las muestras, por lo que no se ha realizado una cuantificación de estos órdenes, dado que la baja sensibilidad del método daría lugar a una cuantificación imprecisa al tratarse de un porcentaje tan reducido. Presentaban morfología de cocos y cocos irregulares.

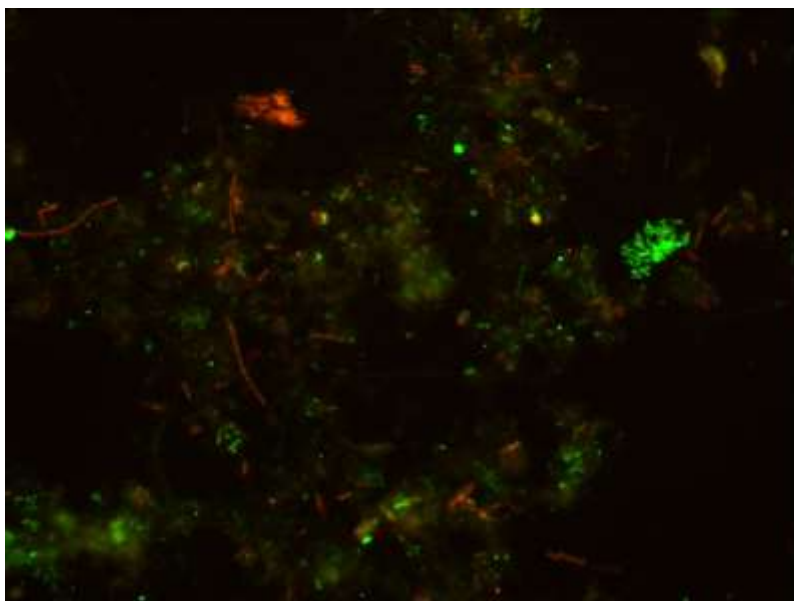


Figura 21. Arqueas metanogénicas del orden Methanosarcinales detectadas por la sonda MSMX860 (imagen a 630x).

Muestras Ontinyent

En las tablas 25 y 26 se muestran los resultados cuantitativos de cada sonda aplicada para cada una de las muestras estudiadas procedentes del digestor de la EDAR de Ontinyent. Al igual que para los otros digestores, los resultados de la población microbiológica presentan poca variabilidad. Las muestras de este digestor presentaron más autofluorescencia y background que las de los otros dos digestores, lo que dificultó bastante la cuantificación.

Tabla 25. Resultados de la cuantificación de bacterias hidrolíticas, acidogénicas y SRB en las muestras del digestor de Ontinyent: porcentaje de hibridación de distintos niveles taxonómicos respecto del total de bacterias y arqueas acompañado de la incertidumbre.

Muestras	Hidrolíticas y acidogénicas				Sulfatoreductoras			
	Bet42a	CFB560	LGCmix	HGC69a	CFX1223 y GNSB541	SRB385Db	SRB385	Dtm230
8/2/18	2±1	0	0	<1	2±1	<1	<1	0
21/2/18	4±1	0	0	<1	3±1	<1	<1	0
8/3/18	2±1	0	0	<1	3±1	<1	<1	0
21/3/18	3±1	0	0	<1	2±1	<1	<1	0
18/4/18	1±1	0	0	<1	2±1	0	0	0
2/5/18	1±1	0	0	<1	2±1	0	0	0

Tabla 26. Resultados de la cuantificación de arqueas metanogénicas en las muestras del digestor de Ontinyent: porcentaje de hibridación de distintos niveles taxonómicos respecto del total de bacterias y arqueas acompañado de la incertidumbre.

Muestras	MSMX860	MX825	MS821	MG1200b	MB311	MC1109
8/2/18	3±1	3±1	0	<1	0	0
21/2/18	1±1	1±1	0	<1	0	0
8/3/18	3±1	3±1	0	<1	0	0
21/3/18	2±1	2±1	0	<1	0	0
18/4/18	2±1	2±1	0	<1	0	0
2/5/18	3±1	3±1	0	<1	0	0

En la figura 22 se representa la abundancia relativa de los microorganismos detectados en cada muestra del digestor de Ontinyent. Las metanogénicas del orden *Methanosarcinales* (MSMX860) pertenecieron en su totalidad al género *Methanosaeta* (MX825), por lo que en el gráfico se presenta la abundancia del género.

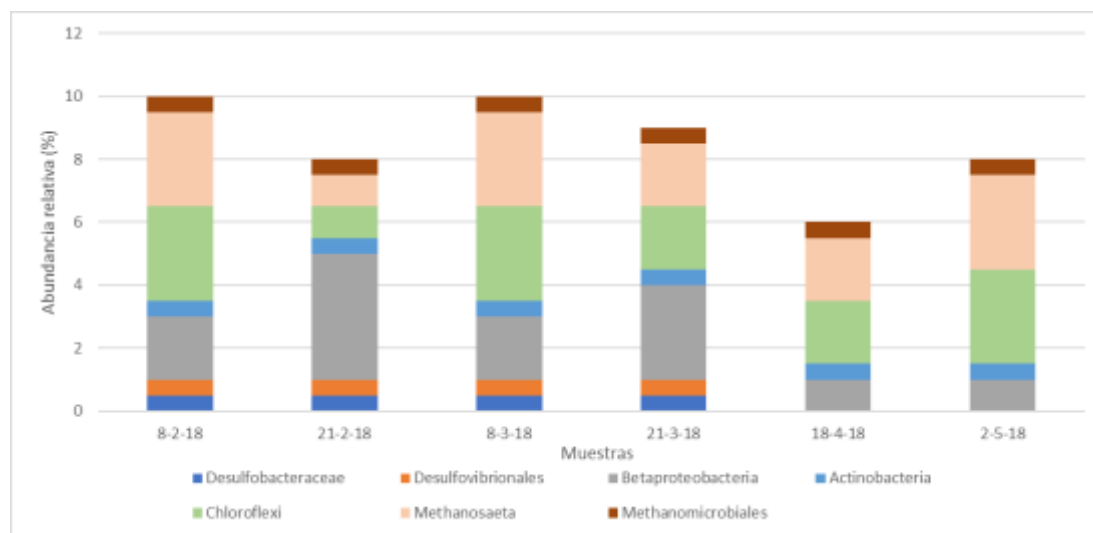


Figura 22. Abundancia relativa de la población de bacterias y arqueas en el digestor anaerobio de Ontinyent.

Durante la observación de las muestras, las bacterias sulfatoreductoras fueron muy poco abundantes y su cuantificación resultó imposible por el alto brillo de las muestras. Por ello, se ha estimado una abundancia de menos del 1% para las sondas SRB385Db y SRB385.

La sonda de *Bacteroidetes*, al igual que en los otros digestores, no mostró señal positiva en ninguna de las muestras analizadas. Se observaron numerosos puntos pequeños brillantes en el canal rojo pero que también aparecían en el canal verde en rojo. Además, también aparecen en el control negativo, por lo que se llegó a la conclusión de que no correspondían a bacterias.

La sonda Bet42a específica de la clase *Betaproteobacteria* dio señal positiva en todas las muestras analizadas con una abundancia relativa diferente. Algunas de las bacterias identificadas son filamentosas, siendo éstas más abundantes en la muestra del 21/3/18.

Por su parte, la sonda HGC69a (Phylum *Actinobacteria*) mostró escasas señales positivas, por lo que se estimó una presencia menor del 1%.

La mezcla de sondas LGCmix del phylum *Firmicutes* tampoco dio señal de hibridación a pesar de haber realizado la hibridación en dos ocasiones para cada una de las muestras, sin y con lisozima.

El conjunto de sondas del phylum *Chloroflexi* mostró resultados entre el 2 y el 3% en las muestras analizadas.

Al igual que en las muestras de los otros digestores, el orden *Methanosarcinales* representa el grupo más abundante de arqueas metanogénicas. En cuanto a la morfología, ésta era ligeramente diferente a las de las muestras de Gandía y Quart. Se observaron barras formando cadenas (Figura 23). Dentro de este orden, el género *Methanosaeta* también mostró señal positiva. Se detectaron metanogénicas hidrogenotróficas del orden *Methanomicrobiales* en <1% pero no del orden *Methanobacteriales*. Por su parte, la sonda MC1109 (Orden *Methanococcales*), al igual que en las otras muestras, no mostró señales de hibridación.

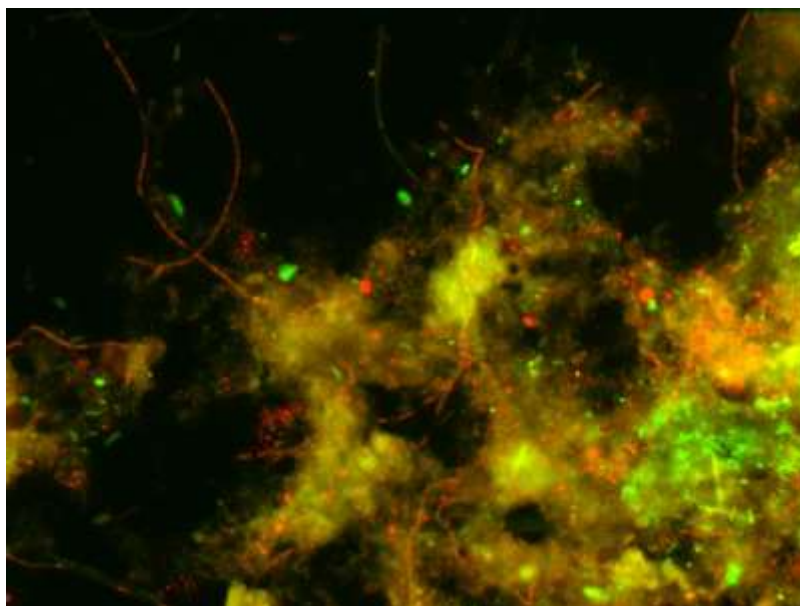


Figura 23. Arqueas metanogénicas del orden *Methanosarcinales* detectadas con la sonda MSMX860 (imagen a 630x).

4.2. Comparación de la microbiología en función de los parámetros operacionales y fisicoquímicos

Tras el tratamiento de los datos proporcionados por Aguas de Valencia, se seleccionaron períodos comparables entre sí de cada digestor para hacer un estudio comparativo de la microbiología. A continuación, se van a comentar cada uno de ellos.

Digestor de Quart-Benàger

Con el fin de estudiar la influencia del TRC sobre la población microbiana detectada en las muestras del digestor de QB, se seleccionaron los períodos mostrados en la tabla 27. Estos períodos difieren significativamente en el TRC con abril-2018 y presentan una misma carga orgánica debida a la adición de cosustrato.

El TRC es un parámetro clave en la composición microbiológica de la digestión anaerobia debido a que los microorganismos que intervienen en este proceso tienen un crecimiento lento, y, por tanto, se requieren tiempos de retención celular elevados para el correcto desarrollo de éste.

Tabla 27. Períodos para estudiar el efecto del TRC en el digestor de QB.

Período	TRC (días)	Carga cosustrato (Kg DQO/Kg SSV·día)	T (°C)	pH	AGV (mg/l)
Mayo-2017	40	0,02	39	7,5	85,2
Junio-2017	42	0,02	39,8	7,6	82,6
Sept-2017	41	0,02	42,9	7,5	64
Abril-2018	30	0,02	33,4	7,5	84,3

La figura 24 representa la población de microorganismos identificada en las muestras analizadas de esos períodos junto con el TRC. Se observa, claramente, como a un TRC más bajo en la muestra de abril-2018 se favorece el desarrollo de las bacterias del Phylum *Actinobacteria*. No obstante, los resultados obtenidos para dichas muestras, no se explican únicamente por el TRC si no que influyen otros parámetros. La temperatura del digestor en abril-2018 también fue más baja en comparación con los otros tres períodos, lo que conlleva a un aumento de la concentración de AGV ya que las metanogénicas reducen su actividad al disminuir la temperatura. Por su parte, el pH se mantiene constante por lo que, aparentemente, no influye en las variaciones observadas. Esto está de acuerdo con estudios previos en los que la dominancia de *Actinobacteria* dependía de las condiciones operacionales del digestor (Cardinali-Rezende *et al.*, 2012).

También se observa un ligero aumento de la población de *Betaproteobacteria* a un TRC más bajo. Esta pasa del 2% en las muestras de mayo-17 y junio-17 y 1% en la de sept-2017 a 3% en la de abril-2018, es decir, se triplica. También se observa en la tabla 27 como los AGV aumentan en la muestra de abril-2018. La población de *Chloroflexi* presenta poca variabilidad en estos períodos y no se observa una tendencia clara con el TRC. Lo mismo sucede con las bacterias sulfatoredutoras y las del phylum *Firmicutes*, que además fueron estimadas con una abundancia del 1% o menor.

En cuanto a las metanogénicas, no se observa ninguna tendencia con el TRC. La población de metanogénicas no se ha visto afectada por una disminución del TRC en la muestra de abril-18, probablemente por la influencia de otros parámetros. Por lo tanto, a pesar de la bajada del TRC, las metanogénicas son capaces de degradar la materia orgánica, aunque dispongan de menos tiempo para la degradación. Además, éstas no varían estadísticamente en las muestras de estos períodos si se considera el error en la cuantificación de ± 1 .

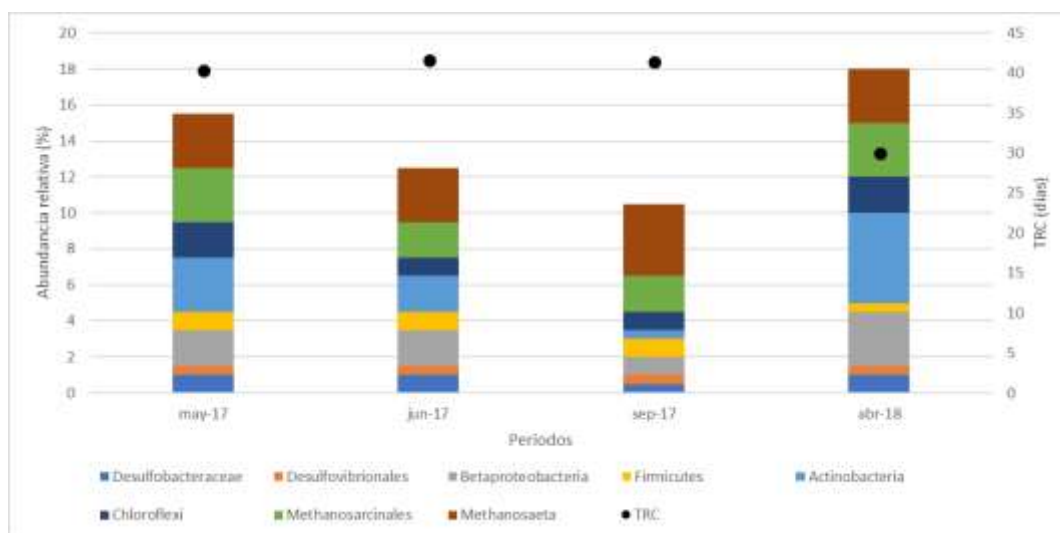


Figura 24. Población detectada en las muestras de los períodos seleccionados y variación del TRC.

Para estudiar el efecto de la carga orgánica debida al cosustrato, se ha seleccionado la carga más elevada introducida que corresponde a la muestra de enero-2018, con un valor de 0,14 Kg DQO/Kg SSV·día. Si se compara la población de la muestra de enero-2018 con la de abril-2017, marzo-2018 y abril-2018 en las que el TRC era el mismo y la carga más pequeña (Tabla 28), se observa que con la mayor carga la población de *Methanosarcinales* (MSMX860) presenta una abundancia del 5% mientras que en el resto de muestras es del 6%, es decir, un aumento de la carga del orden de 5 veces manteniendo el mismo TRC provoca una ligera reducción de la abundancia de *Methanosarcinales* probablemente por inhibición (Figura 25). Sin embargo, estadísticamente, esta relación no es concluyente ya que, si se considera el error en la cuantificación de la población de *Methanosarcinales*, ± 1 , un cambio del 5 al 6% no se considera significativo.

Según Sundberg *et al.* (2013), la comunidad bacteriana es altamente influenciada por las características del sustrato, así como por las condiciones de operación. Sin embargo, no se observa ninguna relación significativa de las bacterias con la carga de cosustrato.

Tabla 28. Períodos para estudiar el efecto de la carga.

Período	TRC (días)	Carga cosustrato (Kg DQO/Kg SSV·día)	T (°C)	AGV (mg/l)	pH
Abril-2017	30	0,04	37,7	95,3	7,5
Enero-2018	31	0,14	37,9	83,5	7,4
Marzo-2018	30	0,04	34,5	63,3	7,5
Abril-2018	30	0,02	33,4	84,3	7,4

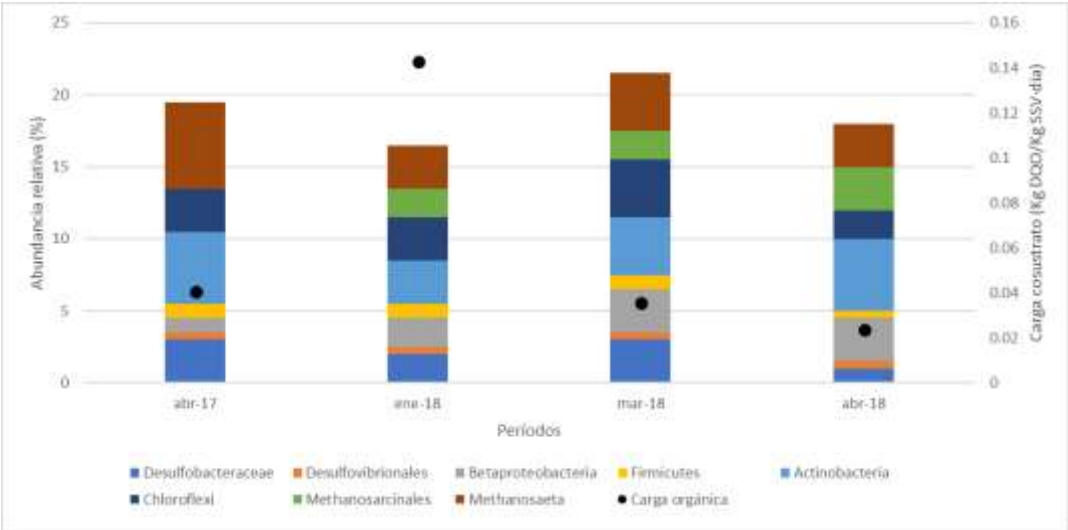


Figura 25. Abundancia relativa de las muestras de los períodos de abril-2017, enero-2018, marzo-2018 y abril-2018 en comparación con la carga del cosustrato.

Por otro lado, se seleccionaron períodos en los que se operó el digestor con el mismo TRC y la misma carga (Tabla 29) para ver si la población detectada variaba y que parámetros tenían influencia en esa variación. En la figura 26 se muestra la población microbiana de cada muestra dentro del período. Se aprecia cierta variabilidad sobre todo en la población de bacterias. Esto indica que otros parámetros que no son el TRC ni la carga están influyendo en dichas poblaciones. Los AGV parecen seguir una tendencia con la población detectada, de manera que una disminución de bacterias (y no de arqueas) va acompañada de una disminución de los AGV en el digestor. Sin embargo, una misma concentración de AGV en la muestra de Sept-17 que en

la muestra de marzo-18 ha ido acompañada de una abundancia de bacterias tres veces mayor (5 al 15%) en la muestra de marzo-18. Esto se debe a la utilización de un TRC menor que favorece a las bacterias frente a TRC altos, ya que un TRC más elevado conlleva una mayor estabilización del fango y, por lo tanto, una mayor muerte de bacterias que son parte de los SSV.

La población de arqueas metanogénicas total detectada (MSMX860) no varía entre las muestras. Sí lo hacen las metanogénicas acetoclásticas, pero no siguen una tendencia que se pueda relacionar con los AGV.

Tabla 29. Períodos con el mismo TRC y carga.

Período	TRC (días)	Carga cosustrato (Kg DQO/Kg SSV·día)	AGV (mg/l)	T (°C)	pH
Abril-17	30	0,04	95,3	37,7	7,5
Marzo-18	30	0,04	63,3	34,5	7,5
Mayo-17	40	0,02	85,2	39	7,6
Junio-17	42	0,02	82,6	39,8	7,5
Sept-17	41	0,02	64	42,9	7,6

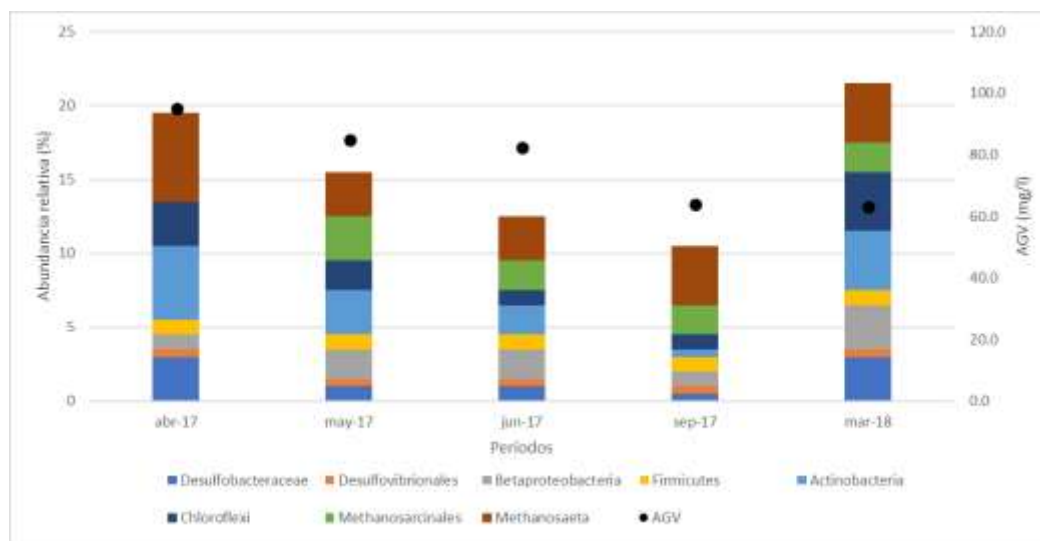


Figura 26. Abundancia relativa de la población microbiana detectada en los períodos de interés en función de la concentración de AGV.

Digestor de Gandía

En el digestor de Gandía, el TRC presenta poca variabilidad, entre 28 y 32, en el período de muestras analizadas. La temperatura también varía poco, 30-34°C. Se va a estudiar la influencia de la carga de cosustrato añadida sobre la población microbiana.

En la figura 27, no se observa ninguna relación clara entre la carga alimentada y la microbiología. En el caso de los microorganismos del Phylum *Chloroflexi* parece que aumentan del 3 al 4% al bajar la carga, aunque la carga es muy baja en todos los casos, pero llega a ser más del doble cuando se ve esa disminución en la población de *Chloroflexi*. No obstante, no se puede

considerar como un resultado concluyente ya que, estadísticamente, si se considera el error en la cuantificación (± 1) un cambio del 3 al 4% no se considera significativo.

Realmente la población es muy poco variable (estadísticamente no varía) debido a que las muestras fueron tomadas cada 15 días y los parámetros operacionales y fisicoquímicos varían muy poco. Se consideran más bien como muestras de un duplicado biológico.

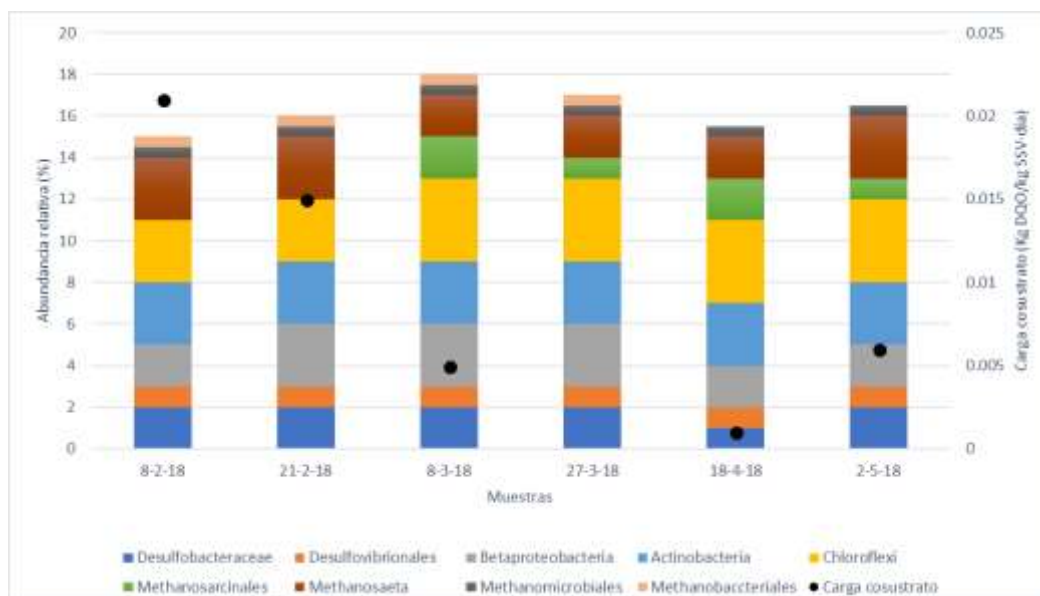


Figura 27. Abundancia relativa de la población microbiana detectada en las muestras del digestor de Gandía en función de la carga orgánica debida al cosustrato.

Digestor de Ontinyent

En los períodos de estudio del digestor de Ontinyent, el TRC varía entre 31 y 36 días. Un aumento del TRC parece ir acompañado de un aumento en la población de arqueas mientras que la abundancia de la población de bacterias total se mantiene constante en las cuatro primeras muestras y disminuye en las dos últimas muestras, aunque el TRC es el mismo (Figura 28). Esta disminución en la población de bacterias al mismo TRC podría explicarse por una disminución de la temperatura en ese período (Figura 29). La población de *Actinobacteria* detectada se mantiene constante con una abundancia menor del 1%, mientras que la de *Chloroflexi* y *Betaproteobacteria* presentan más variabilidad entre las muestras.

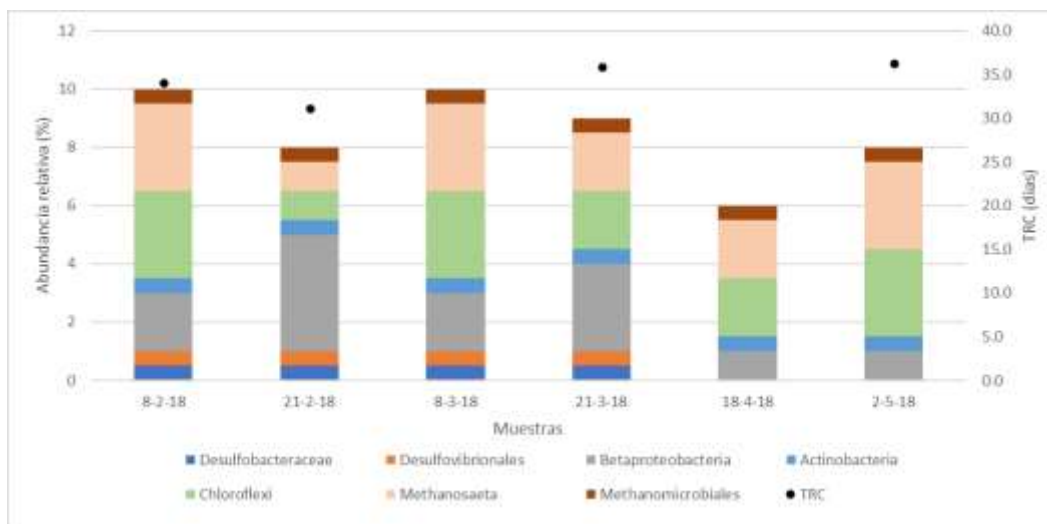


Figura 28. Abundancia relativa de la población microbiana detectada en las muestras del digestor de Ontinyent en función del TRC.

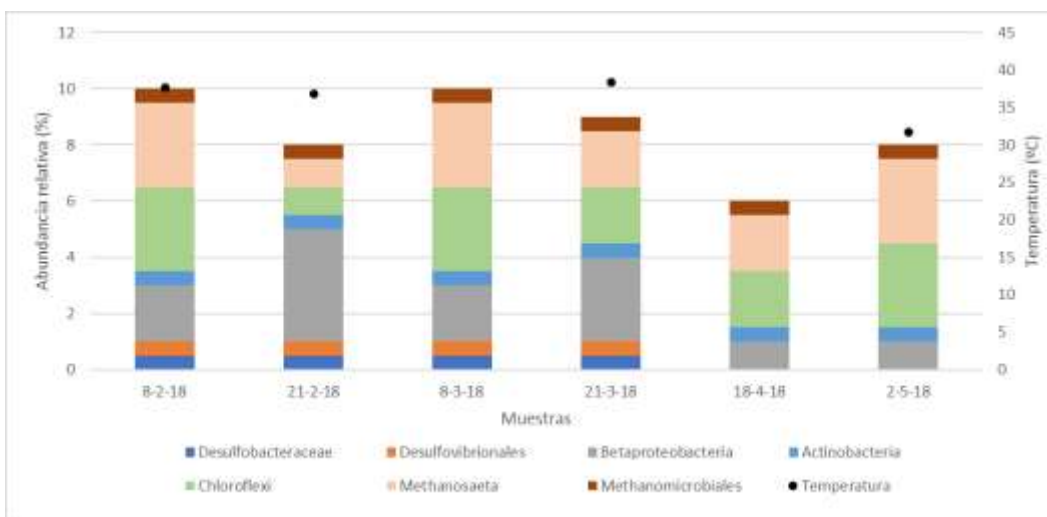


Figura 29. Abundancia relativa de la población microbiana detectada en las muestras del digestor de Ontinyent en función de la temperatura.

De la muestra del 8/2/18 a la de 21/2/18 se observa un aumento del doble en la población de *Betaproteobacteria* que pasa del 2 al 4% mientras que la de *Chloroflexi* disminuye tres veces, del 3 al 1%. La temperatura no influye en este cambio de la población ya que es prácticamente constante y el TRC disminuye de 34 a 31 días, que, aunque no es un gran cambio podría explicar el incremento en la abundancia de *Betaproteobacteria* en la muestra del 21/2/18, considerando que un TRC más alto conduce a una mayor estabilización del fango y, por lo tanto, a un menor número de bacterias. Además, la población de metanogénicas del género *Methanosaeta* también sufre una disminución del 3 al 1%, ya que las metanogénicas se ven favorecidas a TRC más altos que le permitan consumir los AGV generados en las etapas anteriores. Además, el pH pasa de 7,97 a 7,18, y las metanogénicas se ven afectadas por cambios bruscos en el pH.

4.3. Comparación de los rendimientos entre los digestores

La proporción de CH₄ en el biogás oscila entre el 60-72% en volumen, siendo un valor habitual un 67%. El resto del gas es fundamentalmente CO₂ con pequeñas cantidades de H₂S y otros gases. La producción de gas varía en función del contenido en sólidos del fango sin digerir y la actividad biológica en el digestor. Valores típicos son de 500 a 750 L de gas/kg de SSV a la entrada y de 750 a 1100 L de gas/kg de SSV destruidos (Seco A. y Ferrer J., 2003).

En la tabla 30 se muestran los rendimientos teóricos de biogás correspondientes a distintos compuestos presentes en el fango (Montalvo *et al.*, 2000). Se prefiere expresar el rendimiento de biogás en base a Kg de sólidos suspendidos volátiles (SSV) destruidos y no totales (SST) ya que no todos los SST son biodegradables, es decir, que no todos van a producir biogás. Hay que tener en cuenta, además, que alrededor del 10 % de la materia orgánica consumida es empleada en la síntesis celular.

Tabla 30. Rendimiento teórico de gas metano para diferentes sustratos (Montalvo *et al.*, 2000).

Componente	% CH ₄	m ³ /Kg SSV destruido
Carbohidratos (C ₆ H ₁₀ O ₅)	50	0,886
Grasas (C ₅₀ H ₉₀ O ₆)	70	1,335
Proteínas (6C·2NH ₃ ·3H ₂ O)	84	0,587

En los digestores estudiados, la producción de biogás está dentro de ese rango de valores típicos, presentando el digestor de QB un mayor rendimiento en comparación con los otros dos (Figura 30). Basándose en los parámetros operacionales de los digestores, esto podría explicarse por la utilización de TRC mayores que en el digestor de Gandía y Ontinyent (Figura 31). Se debe esperar que a más TRC, el fango esté más estabilizado y se produzca más biogás. Además, elevados tiempos de retención hidráulica favorecen a las poblaciones de arqueas (Moon *et al.*, 2015; Isa *et al.*, 1986). Si se compara la temperatura entre los tres digestores, ésta se mantiene por encima en el digestor de QB (Figura 31). Gandía trabaja por debajo de la temperatura óptima de 35°C, lo que puede explicar que el biogás sea menor. Esta temperatura combina las mejores condiciones de crecimiento de las bacterias con la mayor velocidad de producción de metano. Si se presta atención a la carga orgánica debida al cosustrato (Figura 32), ésta también es mayor en el digestor de QB en comparación con el de Gandía y el de Ontinyent, en el que no se añade cosustrato.

Según los parámetros fisicoquímicos medidos, el pH presenta un valor más estable, alrededor de 7,5, en el digestor de QB mientras que en el de Gandía presenta un valor más bajo y constante de 6,9 y en Ontinyent varía entre 7,2 y 8 (Figura 33). Según Amani *et al.* (2010), un pH entre 6,8 y 7,4 se considera óptimo para el proceso de digestión anaerobia. En cuanto a la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) (Figura 34), ésta es más elevada en los digestores de Gandía y Ontinyent, lo que podría indicar que se han ido acumulando conduciendo a una bajada en el rendimiento de estos digestores. Sin embargo, el pH se ha mantenido dentro de un rango óptimo, por lo que las elevadas concentraciones de AGV han sido contrarrestadas gracias a la correcta capacidad tamponante del sistema. Según Amani *et al.* (2010), una concentración de AGV medidos como ácido acético en el rango de 50-500 mg/l es óptima para que el proceso de digestión anaerobia se desarrolle con buenos rendimientos de biogás.

Una comparación entre el biogás generado en el digestor de Gandía y el de Ontinyent (Figura 30) permite ver que el de Ontinyent presenta un rendimiento ligeramente mayor. La utilización de TRC y temperaturas ligeramente mayores en Ontinyent respecto de los usados en Gandía, podrían explicar los rendimientos de biogás mayores. Sin embargo, se podría decir que a pesar de la adición de cosustrato en Gandía no se obtienen rendimientos mejores que los de Ontinyent, probablemente debido a que los TRC (y la temperatura) son ligeramente más bajos que los empleados en Ontinyent y una cosa compensa a la otra. Además, el pH se mantiene en 6,9 y es ligeramente más bajo que el de Ontinyent (Figura 33), por lo que la más baja producción de biogás en el digestor de Gandía podría ser debida a la inhibición de la actividad metanogénica por un pH bajo. De todos modos, el pH presenta poca variabilidad en los tres digestores, por lo que su influencia sobre el rendimiento del proceso no es muy significativa.

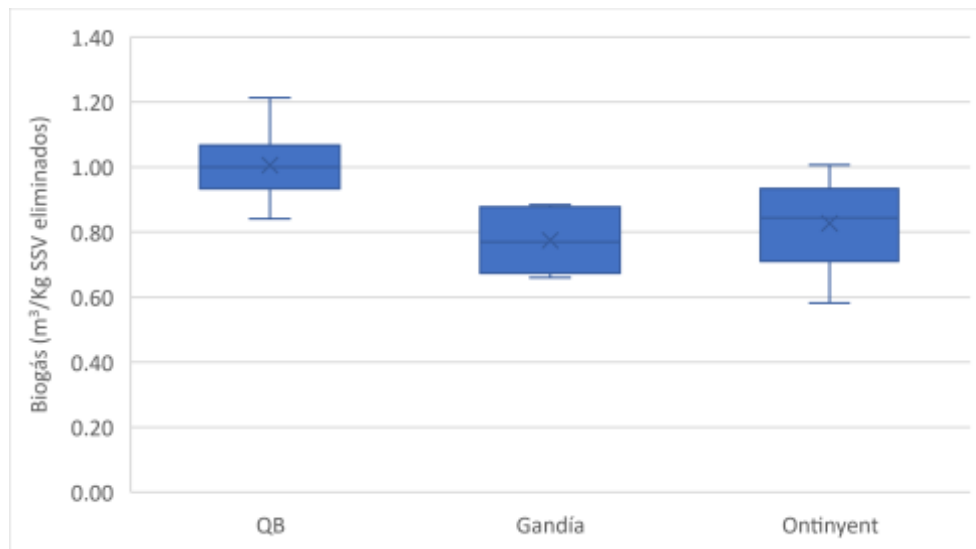


Figura 30. Gráfico de cajas y bigotes para la comparación de la producción de biogás entre los tres digestores estudiados.

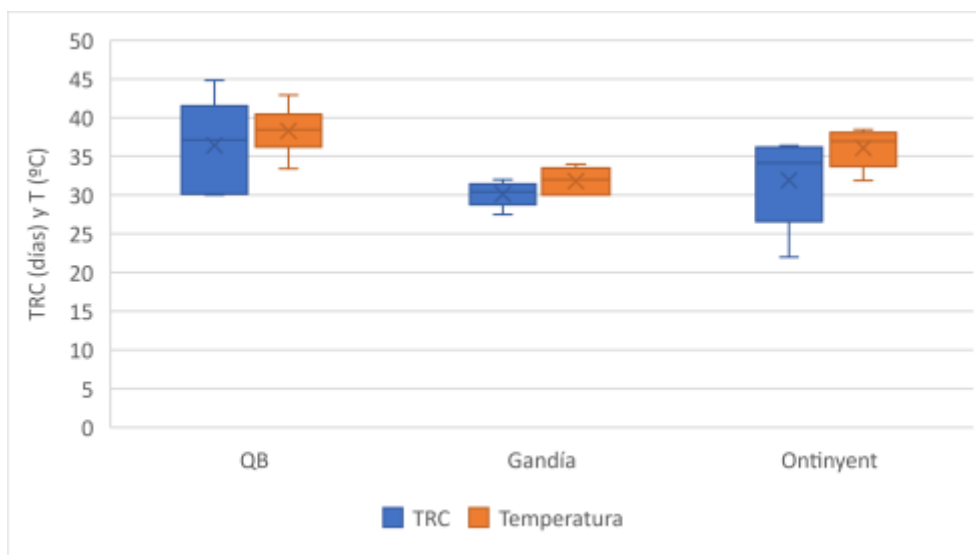


Figura 31. TRC y temperatura en los tres digestores.

Cuando la temperatura cae por debajo de 32°C, se debe tener en cuenta la acumulación de AGV, ya que los microorganismos encargados de su formación pueden permanecer activos a esas temperaturas, pero la producción de metano transcurre más lentamente (Borja *et al.*, 1995). Los microorganismos metanogénicos por su parte, son muy sensibles a las variaciones de

temperatura, ya que ésta influye en factores físicos y biológicos del proceso de conversión. La producción de ácidos puede continuar a un ritmo rápido a 21°C, mientras que la producción de metano se ve gravemente afectada (Gerardi, 2003; Demirel *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008). El rango de temperaturas usado en el digestor de Gandía, más bajo que el de los otros dos digestores, podría explicar la mayor concentración de AGV en este digestor (Figura 34) y un pH más bajo (Figura 33), conduciendo a un contenido en metano en el biogás menor (Figura 30).

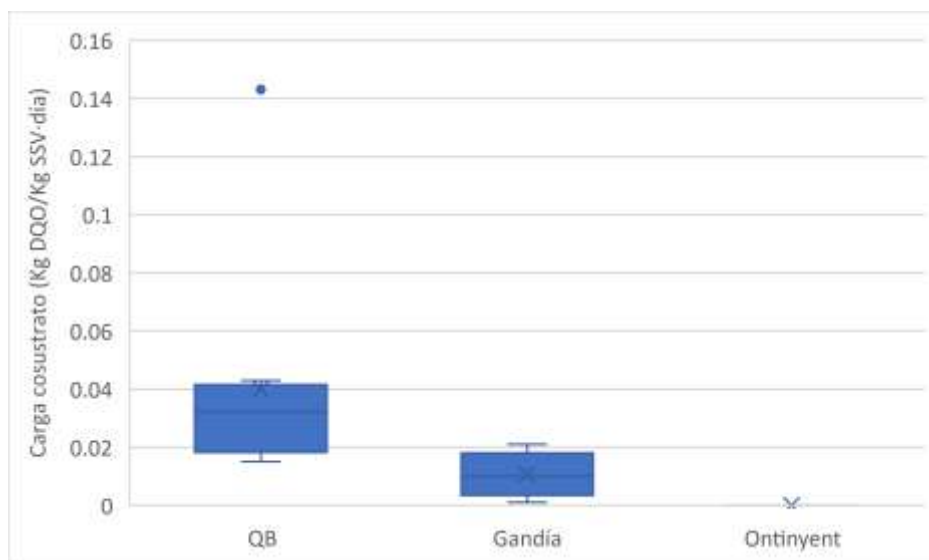


Figura 32. Carga debida al cosustrato en los tres digestores.

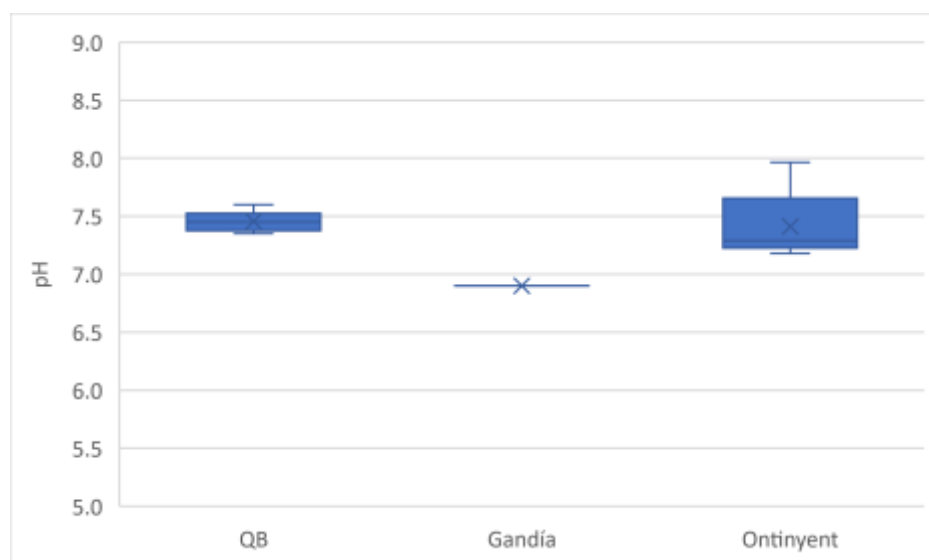


Figura 33. pH en los tres digestores.

Cuando el TRC disminuye, los ácidos grasos volátiles se pueden acumular, dada la lenta velocidad de crecimiento de las arqueas metanogénicas que se ven favorecidas por elevados tiempos de retención celular. Esto podría explicar que la producción de biogás sea menor en el digestor de Gandía y Ontinyent, en los que el TRC es menor en comparación con el digestor de QB y la concentración de AGV es más elevada. Además, en el digestor de Gandía, el pH es ligeramente más bajo.

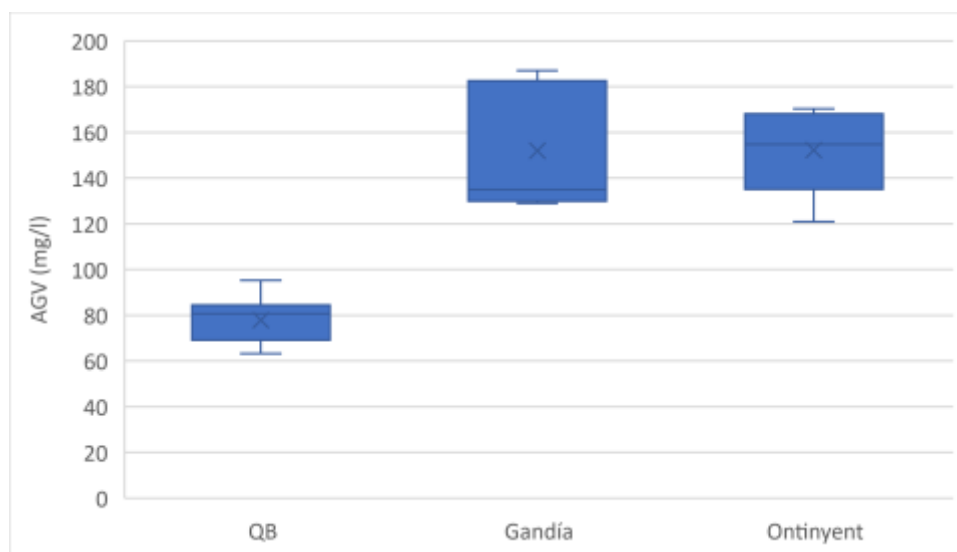


Figura 34. Concentración de ácidos grasos volátiles en los tres digestores.

El contenido en CH_4 del biogás se encuentra dentro del rango típico 60-72% (Figura 35), por lo que es un buen indicador de la estabilidad del proceso. Se aprecia como la proporción en metano en el digestor de QB es más variable que en el de Gandía y Ontinyent. La composición del biogás, entre otras cosas, depende de la temperatura debido a la dependencia de la solubilidad de los diferentes gases con la temperatura.

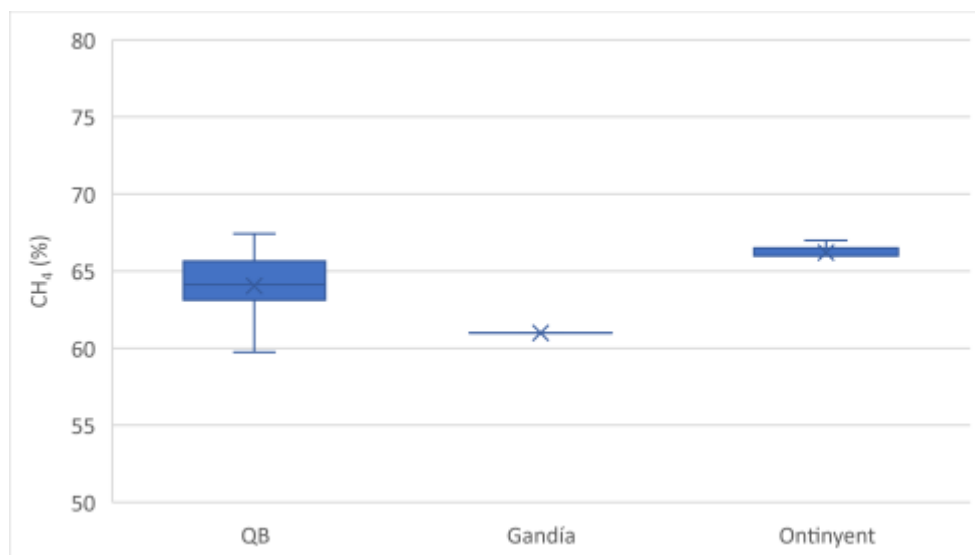


Figura 35. Contenido en metano del biogás en los tres digestores.

Por lo tanto, la producción de biogás es, en general, más elevada en el digestor de QB, debido a la utilización de parámetros operacionales como el TRC, temperatura y carga orgánica más elevados. Mirando las figuras 36, 37 y 38, donde se representa la producción de biogás en función de los parámetros operacionales para cada digestor, se puede ver como existe una tendencia de mayor producción de biogás al aumentar el TRC, la temperatura y la carga de cosustrato.

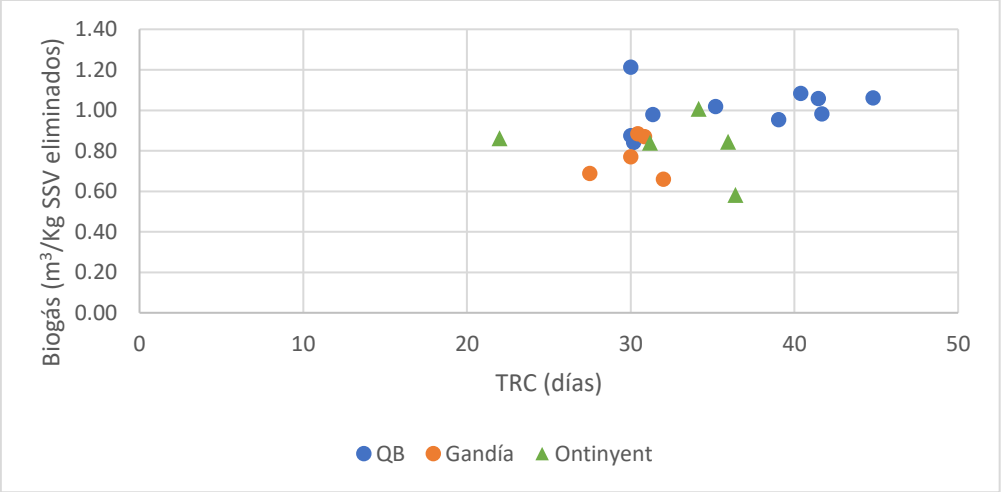


Figura 36. Comparación de la producción de biogás entre los tres digestores según el TRC.

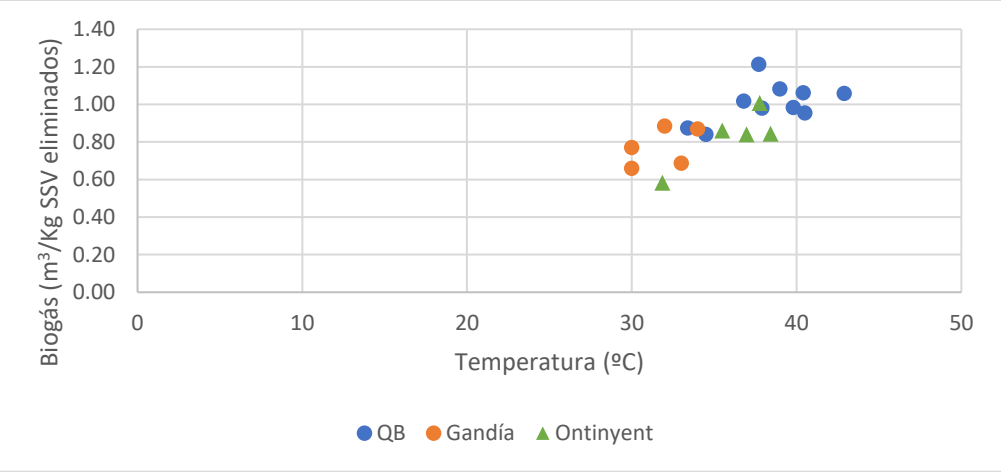


Figura 37. Comparación de la producción de biogás entre los tres digestores según la temperatura del proceso.

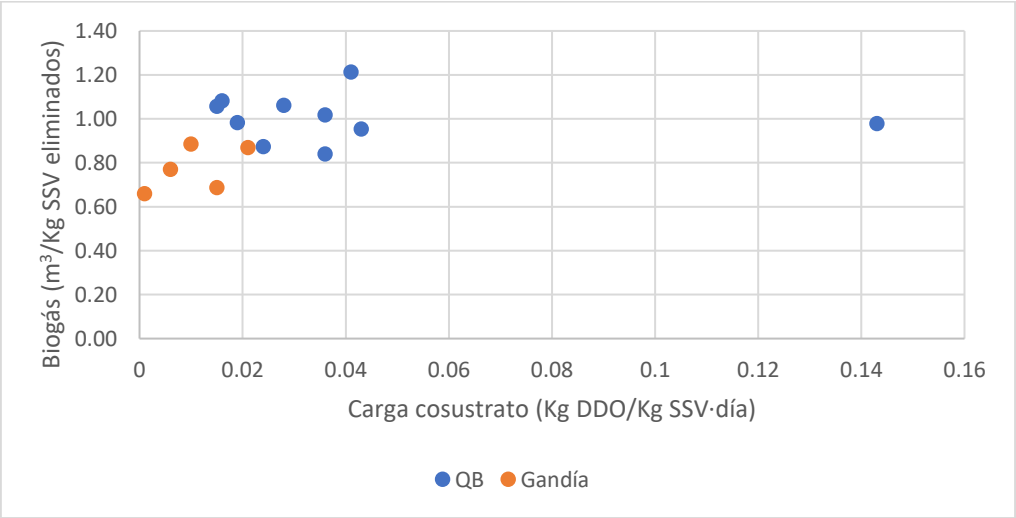


Figura 38. Comparación de la producción de biogás en los digestores de QB y Gandía según la carga del cosustrato.

En la figura 38 puede verse como una carga del orden de 4 veces mayor a las demás utilizadas en el digestor de QB no ha conducido a una producción de biogás mucho mayor. La relación DQO introducida/Biogás producido (o más bien metano) no tiene por qué ser lineal. Se podría decir que, aparentemente, existe un valor a partir del cual un aumento de la carga orgánica conduciría a una acumulación de ácidos debido a que las bacterias fermentativas crecen más rápido que las metanogénicas, conduciendo a una disminución en la producción de biogás. Sin embargo, no se ha observado un aumento pronunciado en la concentración de AGV (han pasado de 71 a 84 mg/l) pero si una reducción en el porcentaje de metano en el biogás, presentando los valores más bajos durante todo el período de estudio (60%). También, el TRC era menor (30 días), por lo que las metanogénicas necesitaban más tiempo para consumir esos AGV.

En la figura 39 se muestra la población de bacterias detectada en los tres digestores. En los tres digestores se detectó la misma comunidad bacteriana a excepción del phylum *Firmicutes* que solo se identificó en el digestor de QB con una abundancia del 1%, lo que podría estar unido a la mayor producción de biogás de este digestor. Según Abendroth *et al.* (2015), *Firmicutes* fue particularmente abundante en digestores con alta producción de biogás (3000-5000 ml/l) mientras que cuando la producción de biogás era menor (0-1500 ml/l) este phylum estuvo muy poco presente. En nuestro estudio, el digestor de QB presenta un mayor rendimiento de biogás en comparación con los otros dos lo que podría estar relacionado con la presencia de bacterias del phylum *Firmicutes*.

Las bacterias del phylum *Firmicutes* han sido descritas como principales degradadores de material celulósico (Hanreich *et al.*, 2013) y generan sustratos directamente utilizados por las metanogénicas. Un total de 23 géneros diferentes han sido identificados con la habilidad de funcionar como bacterias sintróficas, las cuales convierten ácidos grasos volátiles producidos por las bacterias acidogénicas como butirato en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. La mayoría de estas bacterias sintróficas se encuentran dentro del phylum *Firmicutes* (Schuchmann y Müller, 2014). Por lo tanto, la presencia de *Firmicutes* en el digestor de QB podría incrementar la concentración de acetato e hidrógeno en el digestor, pudiendo beneficiar el crecimiento de las metanogénicas tanto acetoclásticas como hidrogenotróficas. Esto podría apoyar el razonamiento de que la presencia de *Firmicutes* en el digestor de QB esté relacionado con la mayor producción de biogás en este digestor.

Por su parte, el phylum *Chloroflexi* (Figura 39) es ligeramente más abundante en los digestores de Gandía y Ontinyent, digestores en los que el rendimiento de biogás es más bajo si se compara con el de QB. Esto parece estar de acuerdo con resultados vistos previamente de que este phylum fue más abundante en plantas de aguas residuales donde el rendimiento de biogás fue menor (Abendroth *et al.*, 2015). El phylum *Chloroflexi* está compuesto de bacterias hidrolíticas capaces de degradar carbohidratos (Ariesyady *et al.*, 2007) y acidogénicas que producen el sustrato, acetato, que las metanogénicas y las SRB utilizan en presencia de sulfato para desarrollarse.

El phylum *Actinobacteria* presentó más variabilidad entre las muestras y fue más abundante en el digestor de QB, donde además fue el phylum de bacterias predominante. Esto indica que este grupo de bacterias hidrolíticas y acidogénicas predominó cuando la carga de cosustrato fue mayor, resultado consistente con Rincón *et al.* (2008). Quizás la dominancia de este phylum en el digestor de QB esté relacionado con la mayor producción de biogás. Se podría decir que *Actinobacteria* ha contribuido más al tratamiento de los residuos orgánicos que se han añadido en comparación con los otros phylum detectados.

La clase *Betaproteobacteria* del phylum *Proteobacteria* también está presente en los tres digestores con diferentes abundancias. Según Abendroth *et al.* (2015), *Proteobacteria* fue solo

encontrado en plantas con bajo rendimiento en biogás (0-1000 ml biogás/l). En este estudio, la clase *Betaproteobacteria* parece más abundante en el digestor de Gandía y Ontinyent, en los que el rendimiento en biogás es menor en comparación con el de QB.

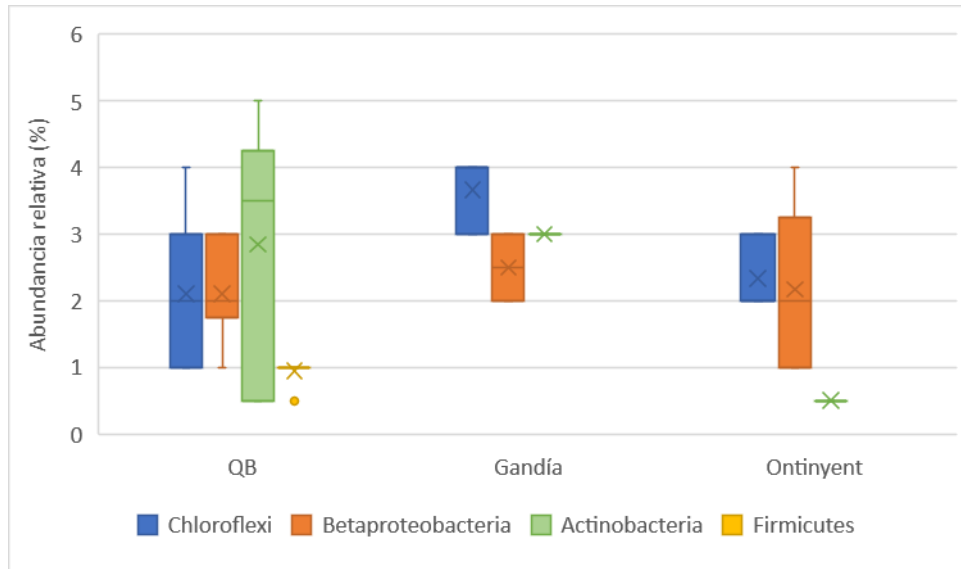


Figura 39. Abundancia relativa de *Chloroflexi*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes* en cada digestor.

Las SRB compiten con las bacterias hidrolíticas, acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas por los sustratos orgánicos o por el hidrógeno y utilizan sulfato como aceptor de electrones generando sulfuro de hidrógeno. Como puede verse en la figura 40, las SRB fueron más abundantes en el digestor de QB, seguido por el de Gandía y se estimaron con una abundancia de menos del 1% en el de Ontinyent. De los cosustratos añadidos en QB se sabe que el procedente de una empresa de fabricación de Biodiesel presenta alto contenido en sulfatos (información adquirida durante mi estancia en prácticas en esta EDAR), motivo por el que se podría explicar la mayor abundancia de SRB en este digestor. Por el contrario, no se tiene ninguna información de la concentración de sulfato en los digestores de Gandía y Ontinyent. Así, el hecho de que en los dos digestores donde se utilizan cosustratos existan más SRB es una conclusión para tener en cuenta.

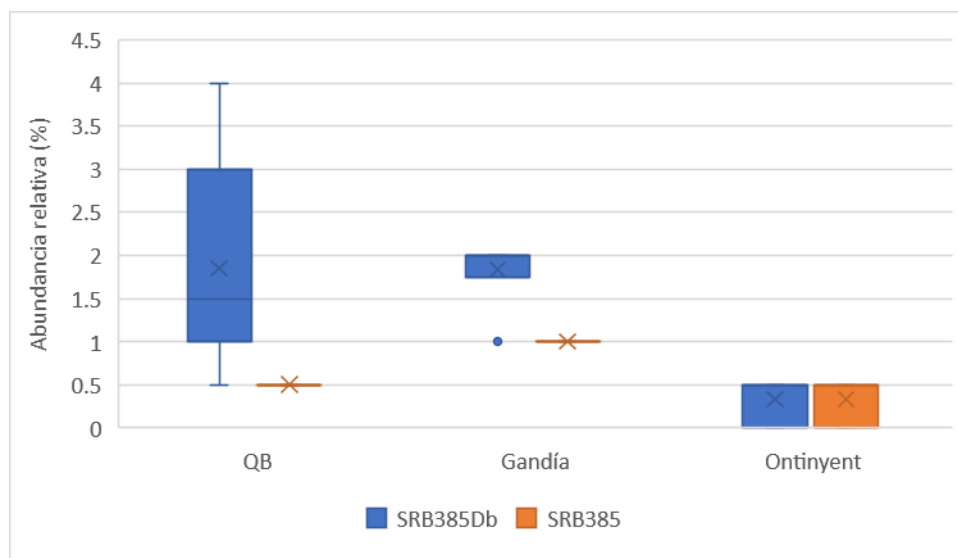


Figura 40. Abundancia de las bacterias sulfatoreductoras en los tres digestores (SRB385: *Desulfovibrionales* y SRB385Db: *Desulfobacteraceae*).

Observando la figura 41, se ve como la producción de H_2S en el digestor de Ontinyent es prácticamente nula mientras que en QB sufre muchas fluctuaciones y presenta valores muy elevados. Esto podría tener relación con la baja detección de SRB en el digestor de Ontinyent. Si las SRB están inhibidas, no se produce H_2S . Esta inhibición podría estar relacionada con la falta de sulfato, la mayor concentración de AGV en este digestor o por la posible más alta concentración de amoníaco (no se cuenta con datos de amoníaco, pero el hecho de que exista menos *Methanosaeta* y se haya detectado algo de hidrogenotróficas en el digestor de Ontinyent podría indicar la presencia de una mayor concentración de amonio) (Xiaohu *et al.*, 2017).

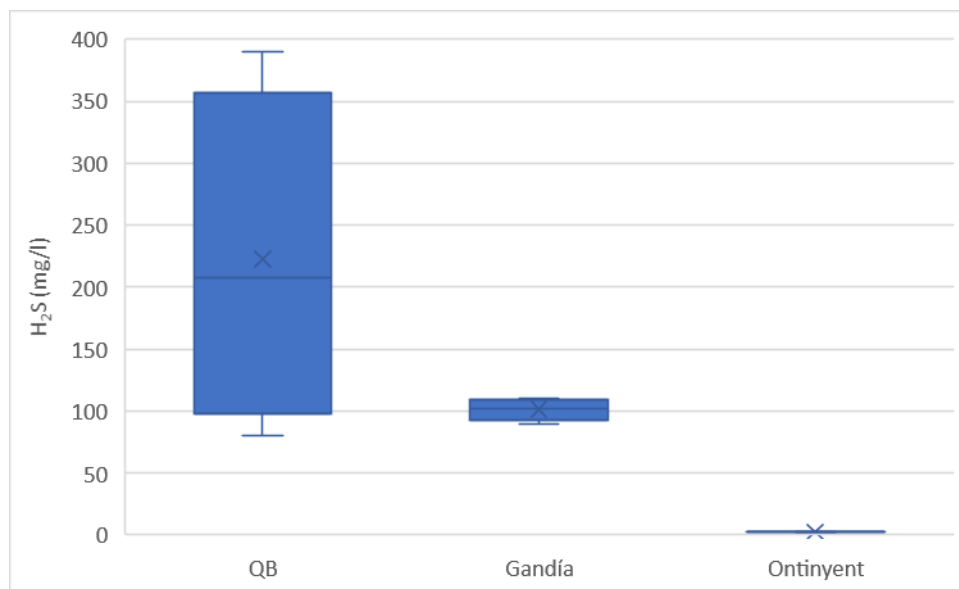


Figura 41. Producción de H_2S en los tres digestores.

El H_2 producido por las bacterias del phylum *Firmicutes* puede ser utilizado por las SRB, lo que podría explicar la mayor abundancia de SRB en el digestor de QB, en el que se ha detectado la presencia del phylum *Firmicutes*.

La abundancia relativa de las SRB detectadas por la sonda SRB385 fue menor que las detectadas por la sonda SRB385Db, tanto en el digestor de QB como en el Gandía, lo que podría indicar que las detectadas por la sonda SRB385Db son las responsables de la mayor producción de H_2S . Así, la mayor abundancia de SRB (sonda SRB385Db) en el digestor de QB es consistente con la mayor producción de H_2S en este digestor.

Por lo tanto, un pH más alto en los digestores de QB y Ontinyent (Figura 33) beneficia a la cantidad de biogás generado, pero no a la calidad de éste, ya que el biogás generado en el digestor de QB presenta una gran cantidad de H_2S .

Debido a la supuesta alta concentración de sulfato en el digestor de QB, las SRB compiten con las metanogénicas hidrogenotróficas por el hidrógeno, motivo que podría explicar que no se hayan detectado estas metanogénicas en este digestor. Sin embargo, la producción de metano no se ve reducida por lo que se podría concluir que está principalmente relacionada con *Methanosaeta*, la metanogénica acetoclástica. Además, si hay suficiente DQO, las metanogénicas apenas se verán afectadas y la producción de metano tampoco. En presencia de sulfato, primero las SRB utilizan la DQO hasta que todo el sulfato haya sido transformado a sulfuros y después la DQO restante podrá ser utilizada por el resto de los microorganismos.

En los siguientes gráficos (Figura 42, 45 y 47) se observa la variación de la población de bacterias en las muestras analizadas de los tres digestores en comparación con la producción de biogás

de cada período. A simple vista no se observa ninguna relación clara entre las bacterias y el rendimiento del digestor.

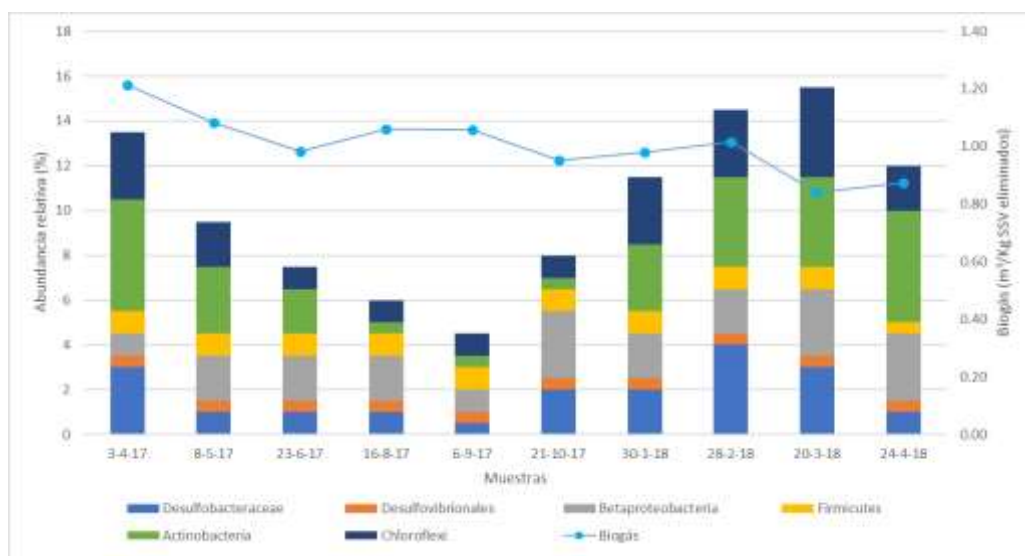


Figura 42. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de QB y de la producción de biogás.

En la figura 43 se observa como la disminución en la población de bacterias fermentativas hidrolíticas y acidogénicas de los phylum *Chloroflexi* y *Actinobacteria* en las 5 primeras muestras fue responsable de la disminución de la concentración de AGV en el digestor y se podría decir que también responsable de la producción de biogás (Figura 42). Luego se produce un aumento en los AGV y en la población de las bacterias de esos phylum en las muestras de octubre y enero, pero esta tendencia se pierde en las tres muestras restantes.



Figura 43. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de QB y de los AGV.

En la figura 44 se representa la población de bacterias y la carga de cosustrato. Puede observarse como no existe una tendencia clara entre ambos. Sin embargo, puede verse como un aumento brusco de la carga (0,14 Kg DQO/Kg SSV-día) va seguido de un aumento en la población bacteriana en las muestras de febrero y marzo. No obstante, este aumento de la carga no coincide con un aumento excesivo en la concentración de AGV (Figura 43), por lo que éstos pueden estar siendo consumidos por las metanogénicas y las SRB.

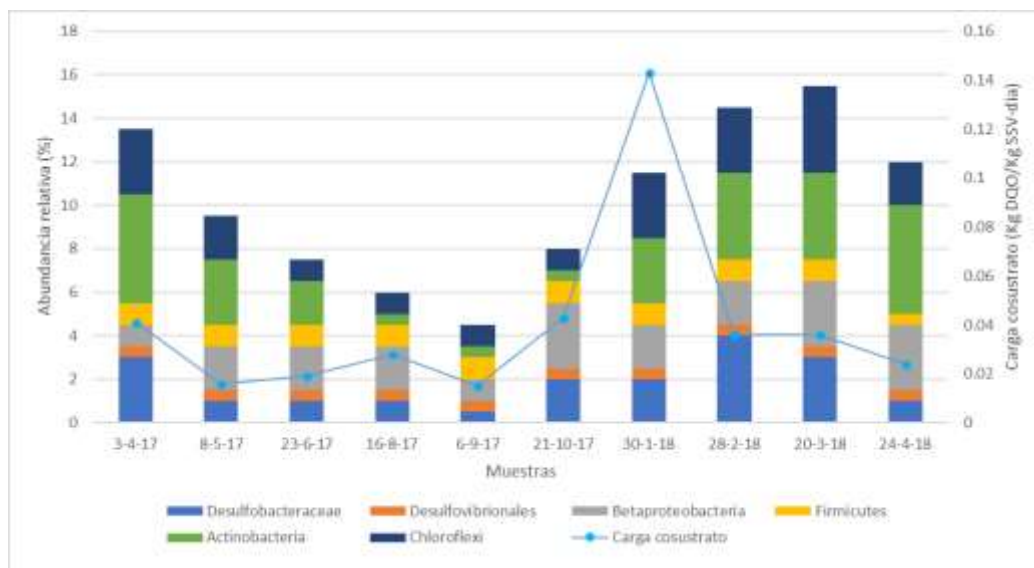


Figura 44. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de QB y de la carga de cosustrato añadida.

En el caso del digestor de Gandía (Figura 45), la población bacteriana total no sufre tantas fluctuaciones entre las muestras analizadas que puedan asociarse a la producción de biogás, ya que solo varía entre el 11 y el 13%. En la figura 46 puede verse como no existe una clara tendencia entre el cosustrato añadido y las bacterias. En las primeras tres muestras se observa un ligero aumento en la población al mismo tiempo que la carga disminuye, cuando se debería esperar una tendencia contraria. Además, en la muestra del 27/3/18, correspondiente a un período en el que no se añadió cosustrato, la población detectada es la misma que en la muestra anterior. Por lo tanto, no se observa un efecto claro del cosustrato sobre la población de bacterias de este digestor.

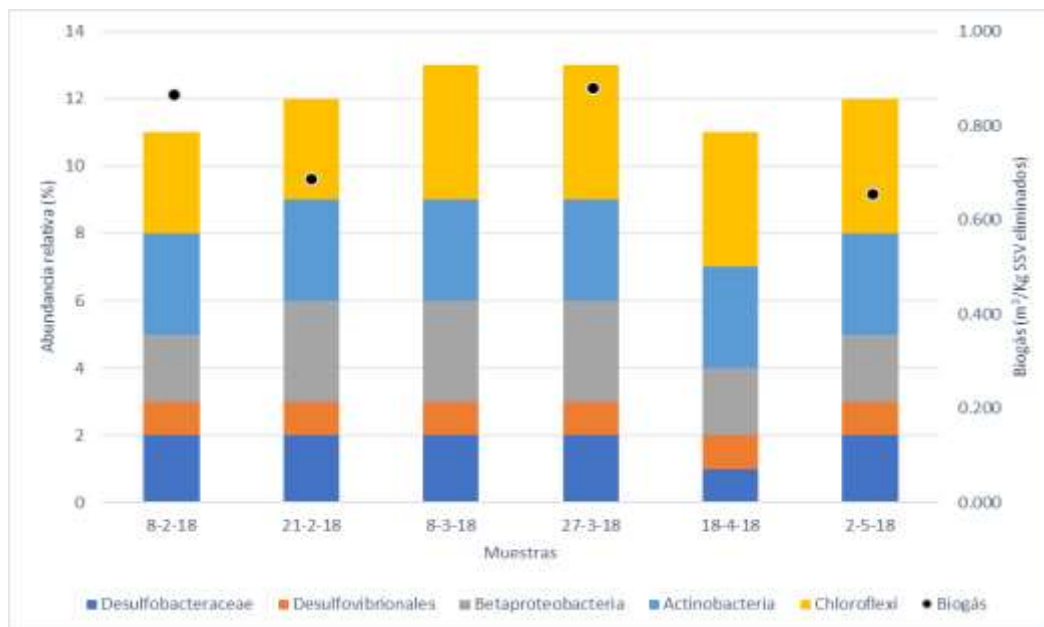


Figura 45. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de Gandía y de la producción de biogás.

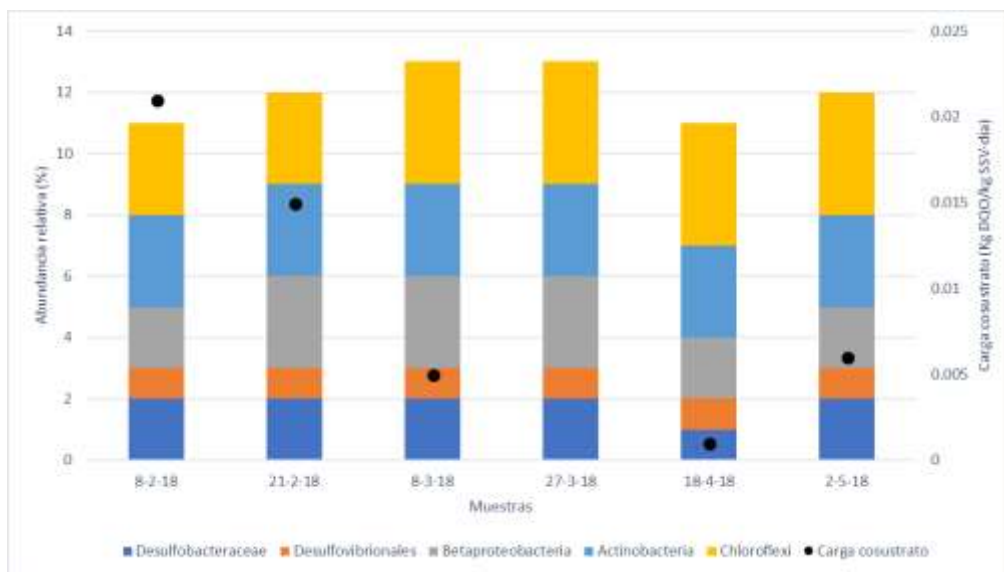


Figura 46. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de Gandía y de la carga de cosustrato añadida.

Por su parte, la población bacteriana detectada en las muestras del digestor de Ontinyent (Figura 47) presenta más variabilidad en comparación con la de Gandía. Se observa como una disminución de la población bacteriana total del 6,5% (en las cuatro primeras muestras) al 4,5% va acompañada de una disminución en la producción de biogás. Esto podría estar relacionado con una disminución de la temperatura en este período, que pasa de 37-38 °C a 32°C. En la figura 48 se muestra la población junto con la concentración de AGV. Estos se mantienen prácticamente constantes, por lo que no siguen un tendencia con las bacterias y la producción de biogás.

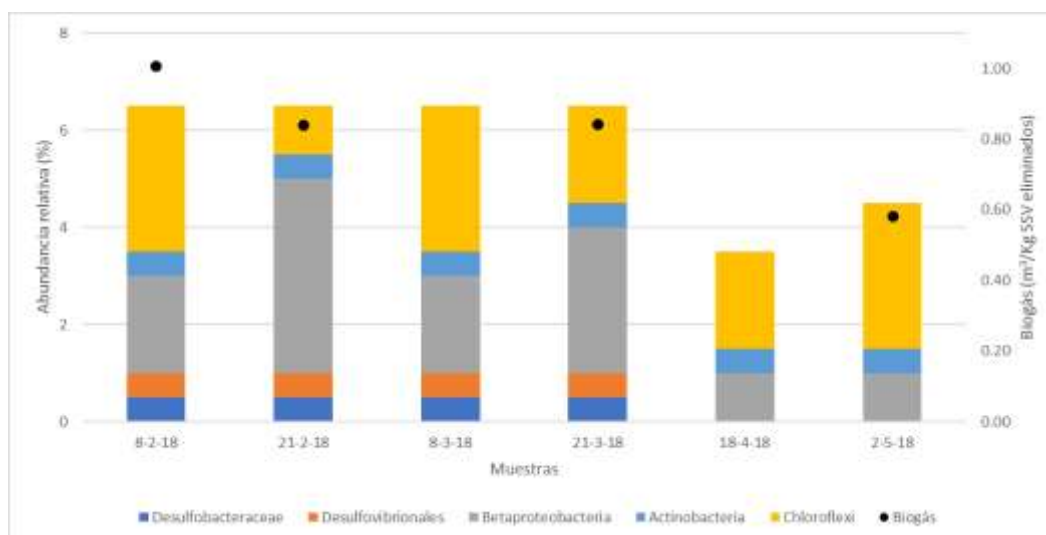


Figura 47. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de Ontinyent y del biogás producido.

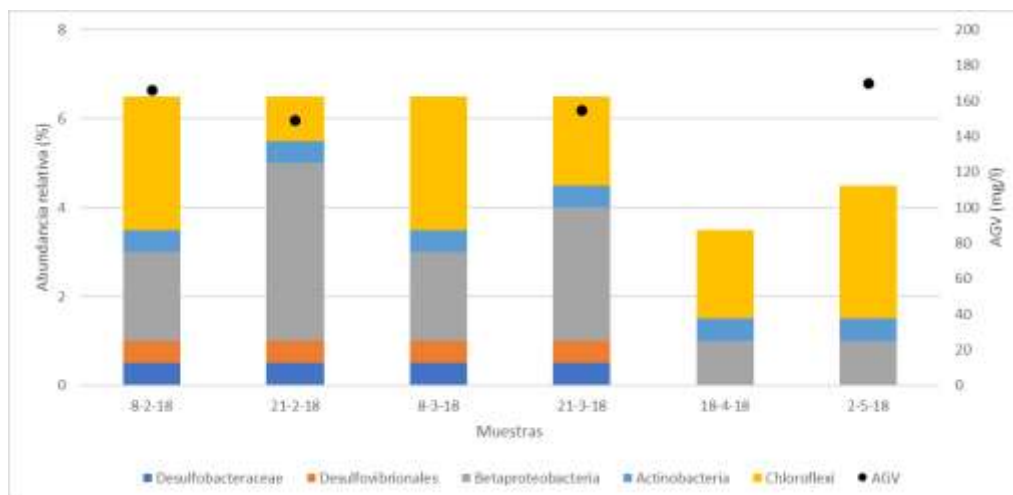


Figura 48. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de Ontinyent y concentración de AGV.

En la figura 49 se muestra un gráfico comparativo de la población de arqueas metanogénicas identificada en cada digestor. En él se observa como las arqueas del orden *Methanosarcinales* detectadas por la sonda MSMX860 están presentes en los tres digestores, siendo el grupo de metanogénicas dominante. En muchos otros estudios, los resultados obtenidos para el dominio arquea se caracterizan porque en la mayoría de los casos, el orden dominante o el único orden identificado dentro de este dominio es el Orden *Methanosarcinales* (Lee *et al.*, 2014; Zamanzadeh *et al.*, 2013). Sin embargo, comparando los tres digestores, éstas son más abundantes en las muestras analizadas del digestor de QB, por lo que la mayor producción de biogás en este digestor podría atribuirse a la mayor abundancia de *Methanosarcinales*.

Dentro del orden *Methanosarcinales*, el género *Methanosaeta* (sonda MX825) es el dominante en todas las muestras analizadas de los tres digestores, resultados consistentes con otros estudios en los que se ha visto la dominancia de este género a bajas concentraciones de acetato (Zheng y Raskin, 2001; Demirel *et al.*, 2008, Nakakihara *et al.*, 2014), lo que significa que la mayor parte del metano generado es producido por una ruta acetoclástica, es decir, la llevada a cabo por metanogénicas que utilizan como sustrato el acético. No se han detectado metanogénicas hidrogenotróficas en las muestras de QB, lo que podría indicar que la mayor parte del metano generado en este digestor procede de metanogénicas que utilizan acético. Por tanto, una posible explicación de la ausencia del resto de arqueas estudiadas, es la falta de sustrato. Por el contrario, si se han detectado metanogénicas hidrogenotróficas del orden *Methanomicrobiales* en los digestores de Gandía y Ontinyent, pero en una abundancia <1%. Además, en el de Gandía, se identificó la presencia de hidrogenotróficas del orden *Methanobacteriales* en cuatro de las seis muestras analizadas, pero también en una abundancia <1%.

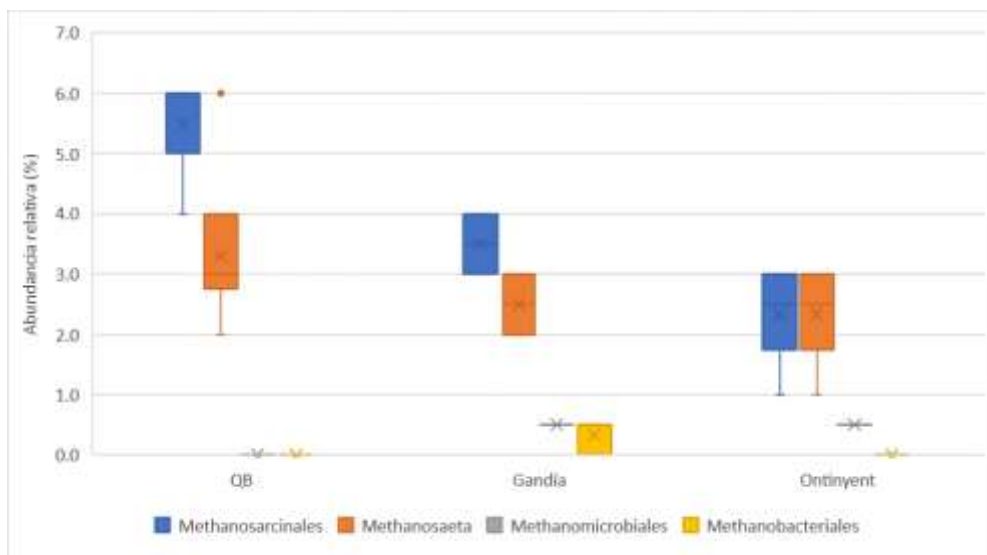


Figura 49. Comparación de la población de arqueas metanogénicas detectada en los tres digestores.

Las SRB compiten con las metanogénicas hidrogenotróficas por el H_2 , lo cual reduce la producción de metano (Chen *et al.*, 2008). En los digestores de QB y Gandía, las SRB predominaron sobre las metanogénicas hidrogenotróficas en la competición por el H_2 . Sin embargo, la no presencia de metanogénicas hidrogenotróficas en el digestor de QB parece no afectar a la producción de metano ya que este se genera principalmente por la vía acetoclástica. La predominancia de SRB en la utilización de H_2 se relaciona con parámetros cinéticos más favorables (Colleran *et al.*, 1995). Según Colleran y Pender, 2002, las SRB fueron dominantes en condiciones mesofílicas (37°C) mientras que las metanogénicas hidrogenotróficas lo fueron a condiciones termófilas (55°C).

La presencia de ácidos grasos volátiles (AGV) es de gran importancia en el proceso ya que constituye el precursor principal de la metanogénesis. Muchos especialistas consideran que la concentración de AGV en un digestor no debe sobrepasar los 2 kg/m³. Se plantea generalmente que una concentración de 0,3 kg/m³ en el digestor puede considerarse óptima (Lorenzo Acosta *et al.*, 2005). En los digestores de este estudio, éstos se encuentran por debajo de 200 mg/l (Figura 34) siendo más elevados en el digestor de Gandía, seguido por el de Ontinyent y más bajos en el de QB.

Según Karakashev *et al.* (2005), la carga orgánica no afecta a la diversidad de metanogénicas, pero si la concentración de amoníaco y de ácidos grasos volátiles. Así, a altos niveles de amoníaco y ácidos (>2000 mg N/l y >300 mg HAc/l) dominó la familia *Methanosarcinaceae* y a bajos (<1200 mg N/l y 10-100 mg HAc/l) *Methanosaetaceae*. La presencia de *Methanosaetaceae* a bajas concentraciones de AGV y amoníaco también está de acuerdo con otros estudios (Koster *et al.*, 1984; García *et al.*, 2000) indicando que las metanogénicas que utilizan acetato son más sensibles a estos compuestos que las hidrogenotróficas. La familia *Methanosaetaceae* es la más vulnerable seguida por *Methanosarcinaceae* mientras que las hidrogenotróficas son las más tolerantes (Karakashev *et al.*, 2006; De Vrieze *et al.*, 2012; Lü *et al.*, 2013). Algunos estudios han sugerido que las metanogénicas hidrogenotróficas son dominantes durante la inhibición debido a altas concentraciones de AGV y amonio (De Jonge *et al.*, 2017). Por lo tanto, la detección de metanogénicas hidrogenotróficas en los digestores de Gandía y Ontinyent, en los que la concentración de AGV es más elevada en comparación con el de QB (pero sin llegar a alcanzar concentraciones tóxicas o que desestabilicen el sistema), podría asociarse a que estas metanogénicas son menos sensibles a estos compuestos. En el digestor de QB, esto podría significar que el fango tiene bajos niveles de amonio y ácidos grasos volátiles y que la actividad acidogénica no es muy elevada.

En la figura 50 se puede ver la variación de la población de arqueas en las muestras analizadas del digestor de QB y la producción de biogás. No se observa ninguna tendencia clara (como se verá más adelante, tampoco se vio tal relación en la matriz de correlaciones ni en el análisis de componentes principales). Los valores más bajos de biogás, 0,84 y 0,87, se corresponden con los valores más bajos de TRC y temperatura de todos los períodos estudiados. Además, en la figura 51 se observa un aumento de los AGV en la última muestra.

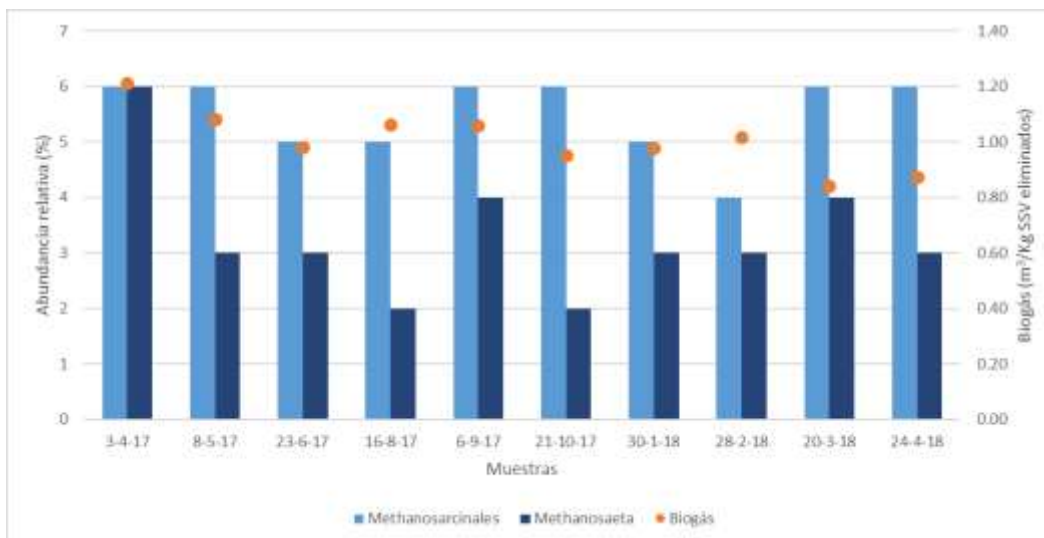


Figura 50. Abundancia de arqueas Metanogénicas y producción de biogás en el digestor de QB. Las metanogénicas del orden Methanosarcinales suponen el total mientras que las del género Methanosaeta están dentro de las anteriores.

En la figura 51 puede observarse como una disminución de la población de metanogénicas acetoclásticas (*Methanosaeta*) en las 4 primeras muestras va acompañado de una disminución de los AGV.



Figura 51. Abundancia de arqueas Metanogénicas y variación de los AGV en el digestor de QB.

En el digestor de Gandía tampoco se observa una relación clara entre las metanogénicas y la producción de biogás durante el periodo de estudio (Figura 52). Esto puede deberse principalmente a que la población de metanogénicas presentó muy poca variabilidad y, por lo tanto, la producción de biogás varía poco. Las metanogénicas hidrogenotróficas, aunque fueron

detectadas, están presentes en una abundancia <1%, por lo que no tienen mucha influencia en el rendimiento de biogás.

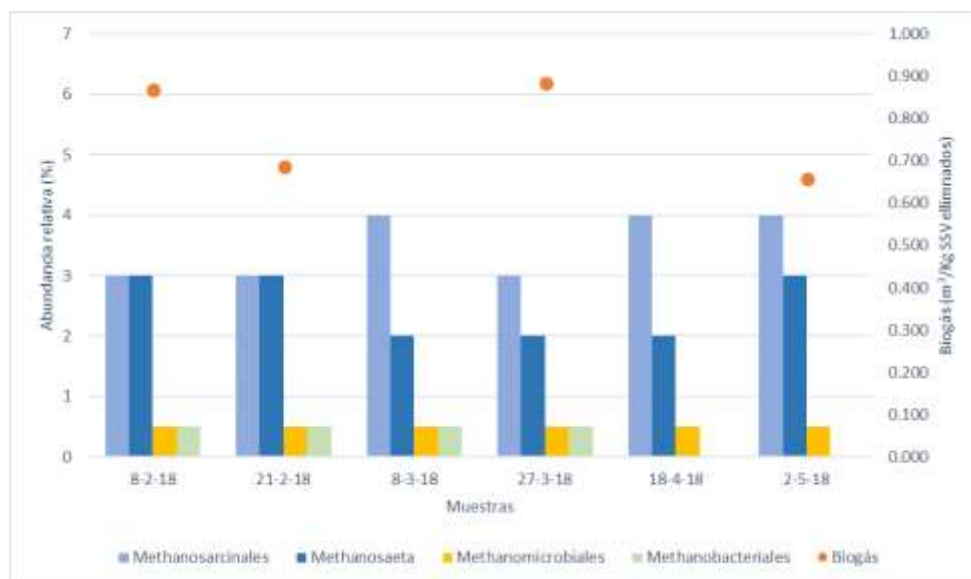


Figura 52. Abundancia de arqueas Metanogénicas y producción de biogás en el digestor de Gandía.

De la misma forma, la población de metanogénicas identificada en el digestor de Ontinyent presenta escasa variabilidad (Figura 53). Sin embargo, se ha visto una abundancia tres veces menor en la muestra del 21-2-18 en comparación con la muestra previa y posterior. Esto podría estar asociado con el alto *background* de estas muestras que dificultó la cuantificación y no por la influencia de ningún parámetro operacional o fisicoquímico, aunque como se dijo anteriormente, esta disminución en la población de arqueas metanogénicas coincide con una ligera disminución del TRC y del pH.

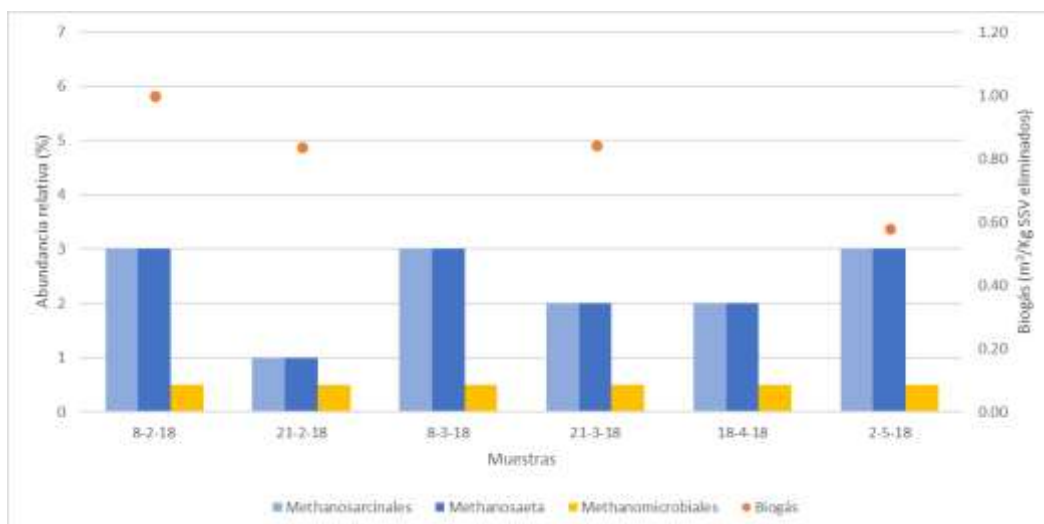


Figura 53. Abundancia de arqueas Metanogénicas y producción de biogás en el digestor de Ontinyent.

Para intentar explicar mejor el rendimiento en biogás, se van a comparar períodos entre los digestores cuando algún parámetro es común. Si se comparan abril-2018 de Gandía (muestra 18/4/2018) y febrero-2018 de Ontinyent (muestra 21/2/2018), cuando ambos trabajan al mismo TRC de 32 días (Figura 54), la producción de biogás es mayor en Ontinyent (Tabla 31). Fijándose en la población de metanogénicas, éstas son más abundantes en Gandía. Cabría esperar que a mayor concentración de arqueas mayor producción de metano, pero esto no es así. Parece que una temperatura mayor en Ontinyent y un pH por encima de 7 han conducido a un mayor

rendimiento en biogás. Sin embargo, son muchos los parámetros que afectan a estos microorganismos en el proceso de digestión anaerobia y por lo tanto en la producción de metano. Por otro lado, en la muestra de Gandía se ha detectado el doble de SRB que en la de Ontinyent, lo que podría explicar el menor rendimiento en biogás de Gandía debido a que estas SRB compiten con las metanogénicas por el sustrato, disminuyendo la generación de metano.

Tabla 31. Comparación entre muestras de Gandía y Ontinyent en periodos con el mismo TRC.

Muestra	TRC (días)	Carga cosustrato (Kg DQO/Kg SSV·día)	Temperatura (°C)	pH	Biogás (m ³ /Kg SSV eliminados)
18/4/18 Gandía	32	0,001	30	6,9	0,7
21/2/18 Ontinyent	32	0	37	7,18	0,84

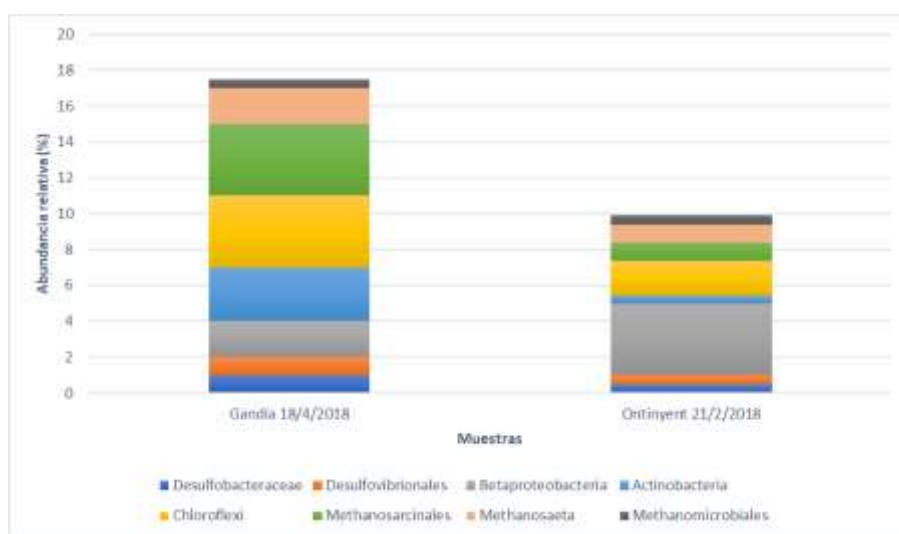


Figura 54. Población detectada en la muestra de abril de Gandía y de febrero de Ontinyent.

Si se comparan los resultados microbiológicos de las muestras de marzo y abril de QB y de abril y mayo de Gandía con tiempos de retención similares (30 días) pero con cargas orgánicas debidas a los cosustratos diferentes (Tabla 32), se observa una pequeña variabilidad en la población detectada (Figura 55). La población de *Methanosarcinales* pasa del 4% en las muestras de Gandía al 6% en las muestras de QB, acompañado de una mayor producción de biogás. Además, también coincide con una mayor carga orgánica y un ligero aumento de la temperatura.

Tabla 32. Periodos comparables entre los digestores de QB y Gandía con el mismo TRC.

Muestra	TRC (días)	Carga cosustrato (Kg DQO/Kg SSV·día)	Temperatura (°C)	pH	Biogás (m ³ /Kg SSV eliminados)
20/3/18 QB	30	0,036	34,5	7,5	0,84
24/4/18 QB	30	0,024	33,4	7,4	0,87
18/4/18 Gandía	32	0,001	30	6,9	0,7
2/5/18 Gandía	30	0,006	30	6,9	0,7

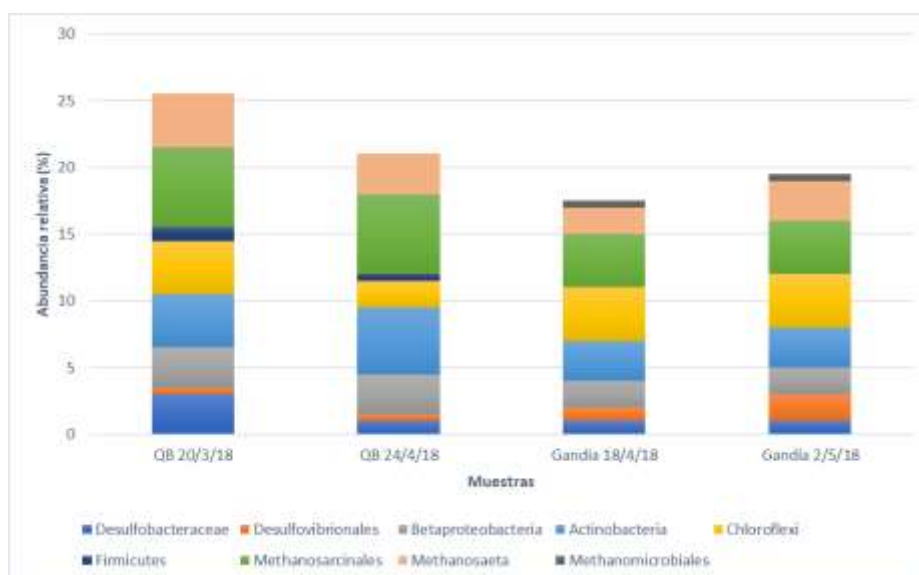


Figura 55. Población detectada en las muestras de marzo y abril del digestor de QB y de abril y mayo del digestor de Gandía.

En general, al comparar el digestor de QB con el de Gandía, se observa un mayor rendimiento en biogás en el de QB en todos los casos debido a una carga de cosustrato mayor, un TRC más alto, una T más alta, un pH ligeramente más óptimo y una población de *Methanosarcinales* más elevada.

Tras la aplicación de FISH se obtuvo una baja señal de fluorescencia debido, principalmente, no a la baja señal de las sondas sino a la elevada señal de *background* que presentan este tipo de muestras. Las muestras que provienen de digestores anaerobios que operan a largos tiempos de retención celular suponen una mayor cantidad de células muertas y su lisis, lo que conlleva a una mayor concentración de residuo inerte que las bacterias no son capaces de hidrolizar y se va acumulando. Este material inerte presenta una alta autofluorescencia, dando lugar a imágenes con mucho brillo, sesgando la técnica y dificultando la cuantificación de los microorganismos ya que es difícil distinguir una señal debida a la hibridación de la sonda con otra que no lo es.

Además, la señal también puede incrementarse debido a la unión no específica de las sondas a contaminantes presentes en la muestra, dando lugar a falsos positivos. Para evitar o minimizar este problema se ha recurrido a la modificación de los tiempos de fijación de las muestras, así como de los tiempos de hibridación.

Después de emplear esta técnica, quedan al descubierto numerosos aspectos que pueden influir en la cuantificación, como son: El origen de la muestra; su homogeneidad; su aplicación sobre el pocillo del portaobjetos ya que si no queda bien extendida puede haber varias capas y al verlo al microscopio realmente solo vemos los microorganismos de la capa más superior; los tiempos de hibridación, las fotos tomadas por el microscopio pueden presentar mucho brillo y la presencia de *background*.

4.4. Relación de los resultados microbiológicos obtenidos con los parámetros fisicoquímicos y operacionales

La comunidad microbiológica presentó más variabilidad entre las muestras en el digestor de QB en comparación con los otros dos, en los que se observó que la población no variaba estadísticamente entre las muestras.

Para evaluar los factores que afectan a estas variaciones temporales y tener una mejor comprensión del comportamiento del proceso, se ha usado una matriz de correlaciones para cada digestor donde se enfrentan uno a uno todos los resultados de la cuantificación microbiológica y los parámetros operacionales del digestor para obtener el correspondiente coeficiente de correlación R. Cuanto más se aproxime R a +1 o -1, más correlacionados estarán ambas variables y el signo nos da información acerca de si la relación es positiva o negativa, respectivamente.

Se ha estudiado la relación de la población detectada en las muestras analizadas con los parámetros operacionales y fisicoquímicos disponibles como la temperatura del digestor, el TRC, el pH, la alcalinidad, la concentración de sólidos suspendidos volátiles y totales en el digestor, la DQO, la carga orgánica de entrada, la producción de biogás y el porcentaje de CH₄.

En el anexo se recogen las matrices completas (Figuras 80, 81, 82 y 83). A continuación, se resumen y explican algunos de los coeficientes de correlación con valores más significativos que se han obtenido de las matrices.

Digestor de Quart-Benàger

La matriz de correlaciones ha mostrado un coeficiente de correlación de -0,67 entre las SRB de la familia Desulfobacteraceae detectadas por la sonda SRB385Db y el porcentaje en metano del biogás (Figura 56). Estas bacterias compiten con las metanogénicas por el sustrato, lo que podría explicar que el desarrollo de bacterias sulfatoreductoras puede estar relacionado con una disminución en el rendimiento de metano si la DQO del digestor no es suficiente. No obstante, no se puede considerar esta relación como concluyente, dado el bajo coeficiente R² obtenido.

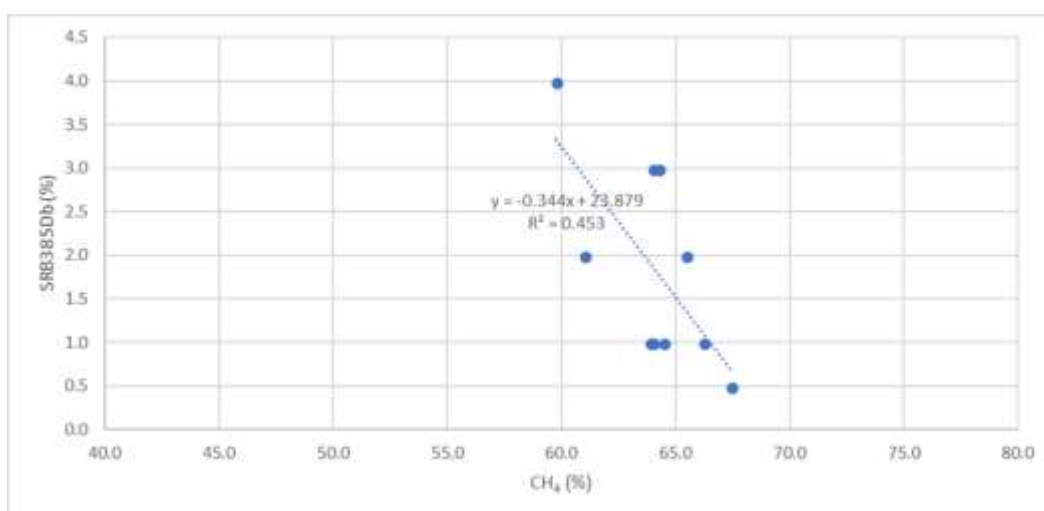


Figura 56. Correlación entre las bacterias sulfatoreductoras detectadas por SRB385Db y el porcentaje en metano del biogás.

Se ha obtenido una fuerte correlación de -0,86 entre las bacterias pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria* y la producción de biogás (Figura 57). Estos resultados son consistentes con

los de estudios previos que sugieren que altas abundancias de *Alfa*, *Beta* y *Gamma-proteobacteria* parecen estar relacionadas con la baja producción de biogás. Según Abendroth *et al.* (2015), Proteobacteria fue solo encontrado en digestores con bajos rendimientos en biogás (0,3-0,6 m³/m³·día). En otro estudio (Lee *et al.*, 2012) donde se hizo una comparación de la microbiología existente en siete digestores anaerobios reales, el phylum *proteobacteria* fue más abundante en el digestor en el que la producción de biogás fue menor (0,2 m³/Kg SSV).

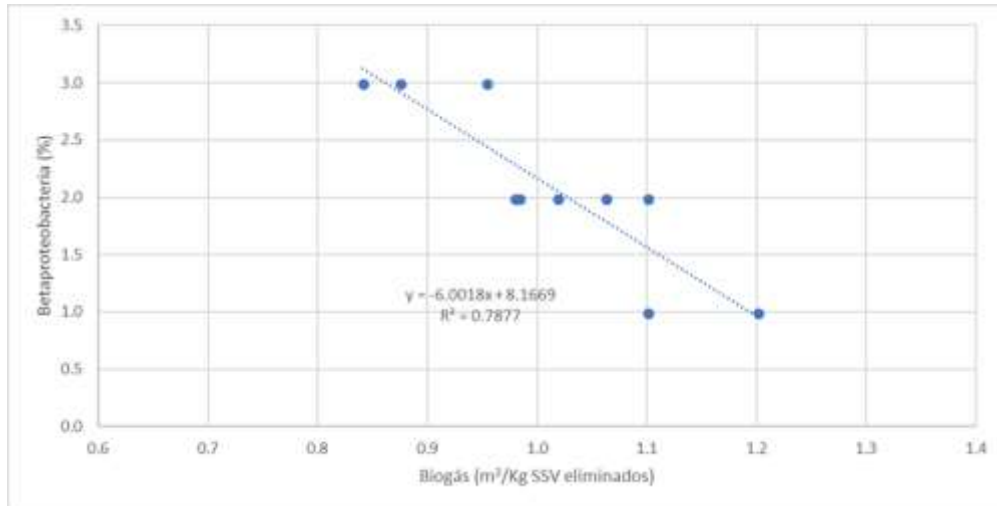


Figura 57. Correlación entre la clase Betaproteobacteria y la producción de biogás.

Estas bacterias son especies hidrolíticas y acetogénicas que utilizan propionato, butirato y acetato (Ariesyady *et al.*, 2007) y también incluye microorganismos que realizan el proceso de nitrificación. Este último grupo no se considera ya que no está presente en los sistemas anaerobios. Las especies acetogénicas producen el sustrato de las metanogénicas y podrían generarlo más rápido de lo que las metanogénicas pueden consumirlo, de manera que se iría acumulando, acidificando el medio y las metanogénicas se inhibirían si la capacidad tamponante del sistema no es la apropiada, conduciendo a una disminución en la generación de biogás. Sin embargo, en la figura 58 se muestran las variaciones del pH durante el período de toma de muestras y puede verse como el pH permanece prácticamente constante, con valores en torno a 7,5. No se observa ninguna bajada brusca del pH. Esto indica que el digestor presenta una capacidad tamponante apropiada (Figura 59). Por lo tanto, las variaciones en el pH durante dicho periodo son mínimas y sus efectos también.

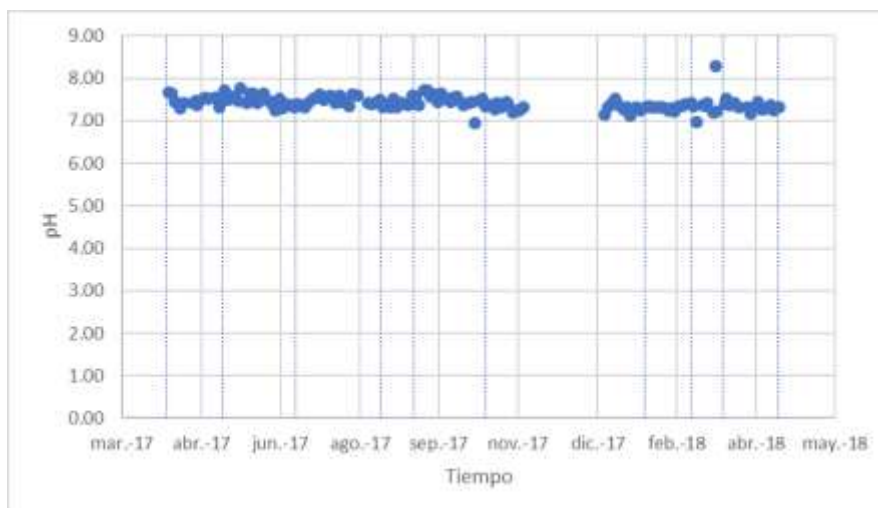


Figura 58. Variación del pH en el digestor de QB durante el estudio. Las líneas azules verticales discontinuas corresponden a las fechas de las muestras analizadas

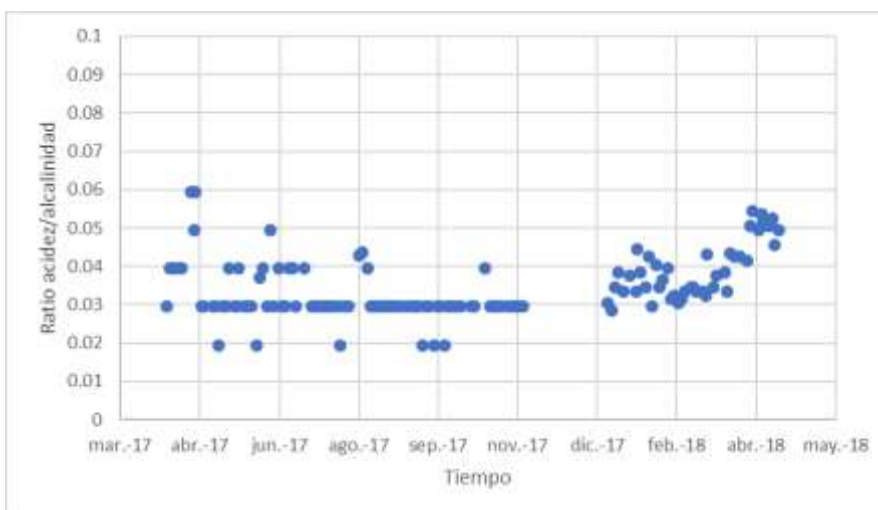


Figura 59. Ratio acidez/alcalinidad en el digestor de QB durante el estudio.

Otra posible explicación puede asociarse con que el acetato puede ser usado tanto por las bacterias de la clase *Betaproteobacteria* como por las arqueas acetoclásticas del género *Methanosaeta* detectadas por la sonda MX825. Según Ariesyady *et al.* (2007), la mayor parte del acetato presente en un digestor anaerobio mesofílico a escala real operado a 40°C, con un TRC de 33 días y con un pH mantenido alrededor de 7,5 fue utilizado por la comunidad bacteriana frente a la de arqueas, y dentro de las bacterias, la clase *Betaproteobacteria* fue el grupo claramente dominante. Por lo tanto, esto podría explicar la correlación negativa existente entre ambos grupos (-0,56) y la correlación negativa con la producción de biogás.

Además, la clase *Betaproteobacteria* es de los grupos más abundantes en los tratamientos aerobios, quizá de ahí la relación negativa con el biogás. Numerosos estudios han mostrado el predominio del phylum *Proteobacteria* en plantas de tratamiento de aguas residuales urbana, siendo *Betaproteobacteria* la clase más abundante, responsable de la eliminación de materia orgánica y nutrientes (Nielsen *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012).

El phylum *Actinobacteria* ha sido el grupo de bacterias que ha presentado más correlaciones con los parámetros operacionales y fisicoquímicos del digestor. Se ha observado una correlación

negativa de 0,85 de las bacterias del phylum *Actinobacteria* con el TRC y la temperatura (Figura 60). TRC y temperaturas altas implica que hay una mayor estabilización del digestato y más muerte de bacterias, lo que podría explicar esta relación negativa. Esta relación se observó al comparar muestras sometidas a distintos TRC cuando la carga debida al cosustrato era la misma (Figura 24). Además, también existe una correlación negativa de 0,75, 0,86 y 0,68 para los SSV, los SST y la DQO, respectivamente, con estas bacterias (Figuras 61 y 62). Una posible explicación a esto sería que los sólidos se han incrementado por otro motivo y no por estas bacterias. Si que se ha visto en otros estudios como a TRC altos existía una menor concentración de AGV (correlación que no se ha visto como fuerte en nuestro análisis pero que si se muestra con signo negativo).

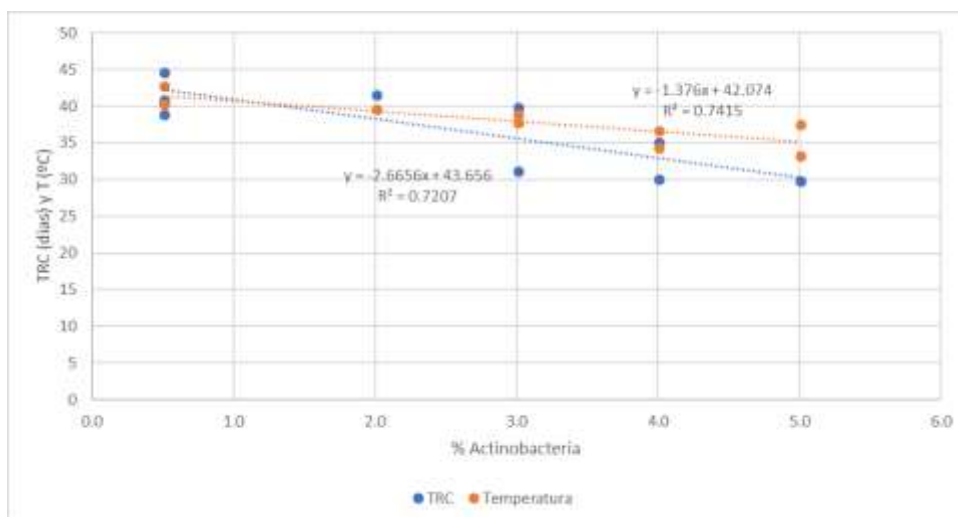


Figura 60. Correlación del phylum *Actinobacteria* con el TRC y la temperatura.

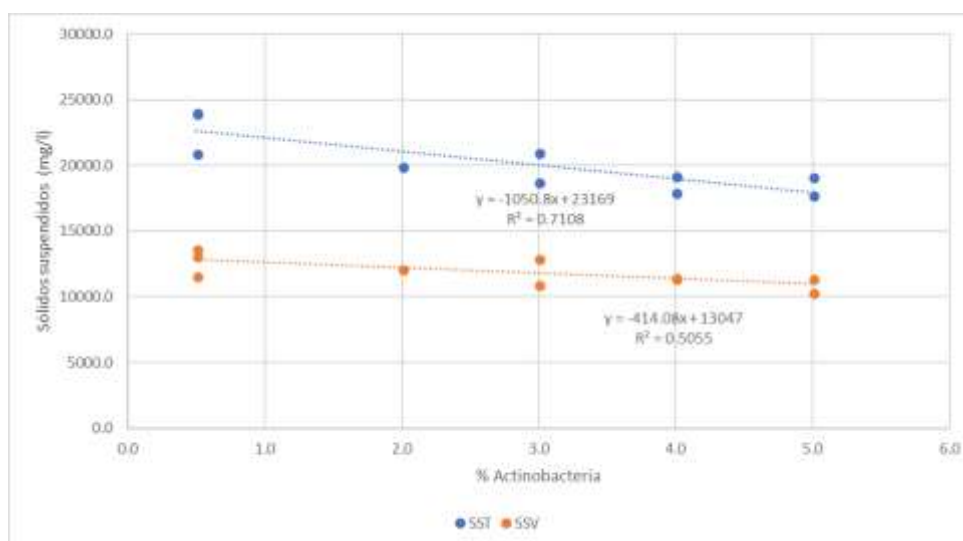


Figura 61. Correlación entre el phylum *Actinobacteria* y los sólidos suspendidos totales y volátiles del digestor.

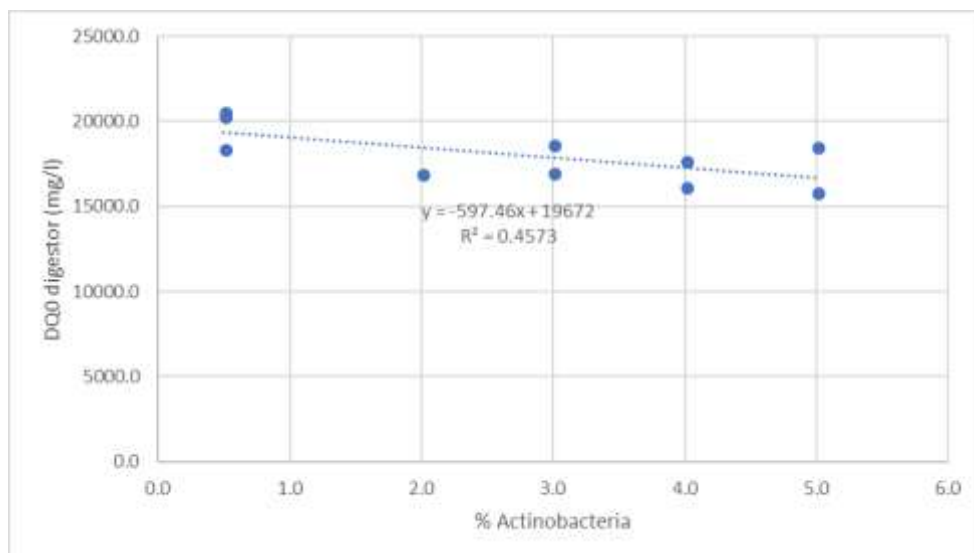


Figura 62. Correlación entre la DQO del digestor y las bacterias del phylum Actinobacteria.

Además, para las bacterias de este phylum se ha obtenido una correlación de 0,88 con la relación acidez/alcalinidad (Figura 63), ya que estas bacterias son acidogénicas y generan ácidos, conduciendo a un aumento de esta relación si la alcalinidad del sistema no es suficiente. De los grupos de bacterias detectados, se podría decir que este phylum es el más responsable de la variabilidad de AGV en el digestor.

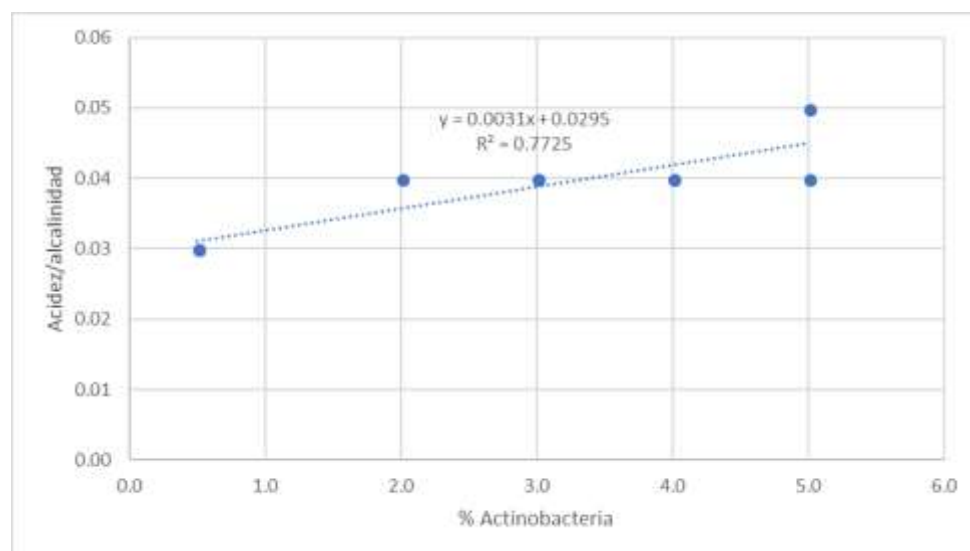


Figura 63. Correlación entre el phylum Actinobacteria y la relación acidez/alcalinidad.

Para las bacterias del Phylum *Chloroflexi* también se ha visto una correlación negativa de -0,8 con el TRC y de -0,72 con la temperatura, probablemente por el mismo motivo que con el phylum *Actinobacteria*.

Estas correlaciones con el TRC y la temperatura pueden observarse en la figura 64. En ella puede verse una tendencia de disminución de la abundancia de los phylum *Actinobacteria* y *Chloroflexi* al aumentar el TRC y la temperatura en las 5 primeras muestras. En el resto de las muestras la tendencia no es tan clara, pero podría ser responsable de los elevados coeficientes obtenidos. Además, puede observarse como el resto de los grupos de bacterias detectados no siguen una tendencia con el TRC o no presentan variabilidad entre las muestras.

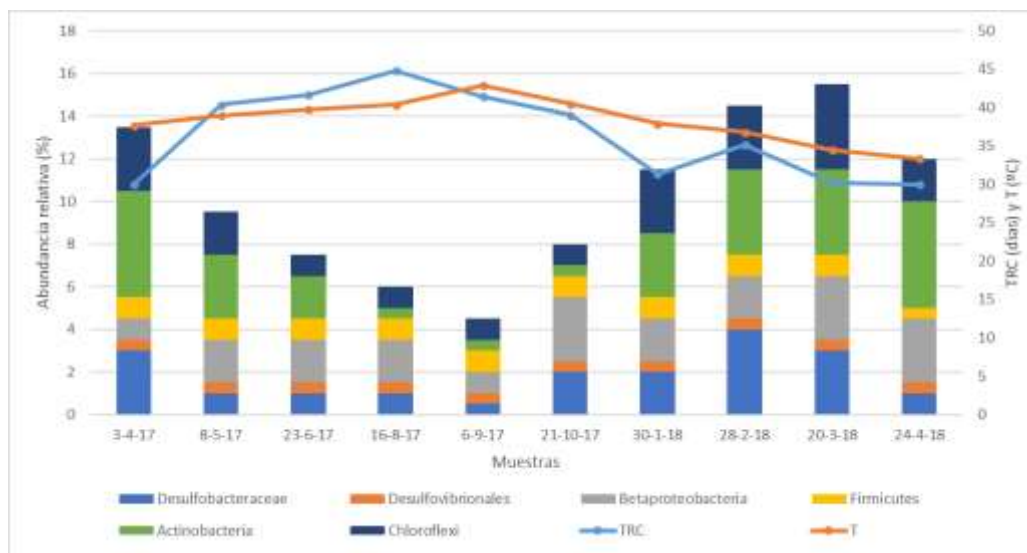


Figura 64. Evolución temporal de la población de bacterias en el digestor de QB y del TRC y la temperatura.

Estos dos últimos phylum de bacterias están correlacionados entre sí de forma positiva (Figura 65), ya que ambos presentan una correlación negativa con el TRC y la temperatura y además una relación negativa con el porcentaje en metano del biogás (0,6 para el phylum *Actinobacteria* y 0,65 para *Chloroflexi*). Ambos están constituidos por bacterias hidrolíticas y acidogénicas y se podría pensar que cuanto más ácidos generen más sustrato tendrían las metanogénicas para generar metano. Sin embargo, esta correlación no refleja esto.

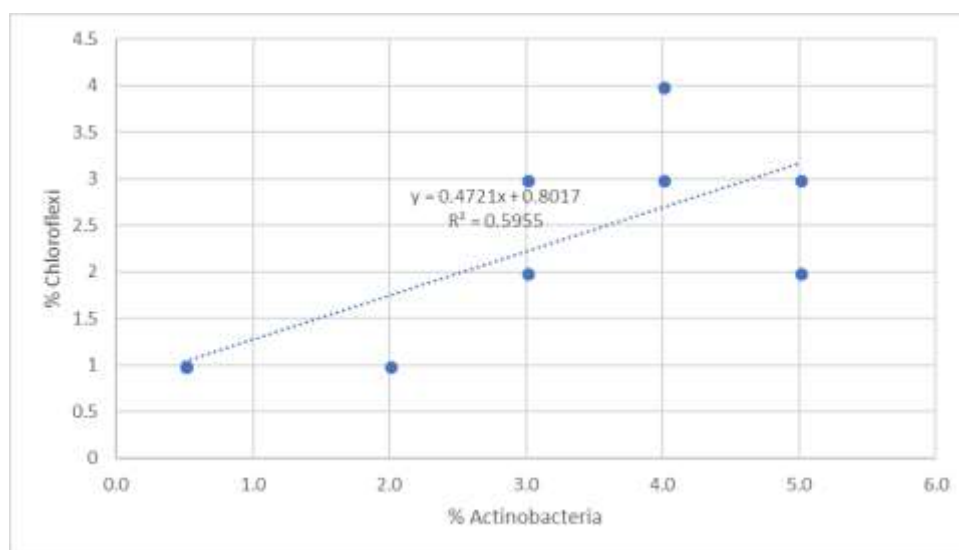


Figura 65. Correlación entre las bacterias del phylum *Actinobacteria* y *Chloroflexi*.

A parte de la relación entre *Chloroflexi* y *Actinobacteria*, no se ha obtenido ninguna otra correlación destacable entre grupos de microorganismos. Se hubiera esperado, por ejemplo, que un aumento de la población de bacterias SRB condujera a una disminución de las metanogénicas, ya que compiten por el mismo sustrato. Sin embargo, no se ha encontrado relación alguna. Esto podría indicar que existe suficiente DQO para consumir. La ratio DQO/sulfato aportaría más información acerca de esta competencia, pero no se tienen datos sobre la concentración de sulfato en el digestor. Una ratio DQO/SO₄ menor se traduce en que las bacterias sulfatoreductoras consumirán la mayor parte del sustrato, debido a la disponibilidad de sulfato, mientras que a mayor ratio DQO/SO₄ habrá un mayor exceso de DQO (carencia de sulfato) que será consumido por las arqueas (Giménez *et al.*, 2011).

La estabilidad operacional de los digestores anaerobios puede verse afectada por una sobrecarga (Gujer and Zehnder, 1983). Un incremento de la carga puede dirigir a la acumulación de ácidos grasos conduciendo a efectos tóxicos y causar una caída del pH que causaría una disminución de la actividad metanogénica (Gujer y Zehnder, 1983; Appels *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009). Según este análisis, se ha obtenido una correlación no concluyente (-0,53) entre el porcentaje en CH₄ del biogás y la carga del cosustrato, lo cual es coherente con el hecho de que no se haya producido ninguna inestabilidad operacional durante el período analizado.

Digestor de Gandía

No se ha podido estudiar la relación del pH y del contenido de metano del biogás con las poblaciones detectadas ya que los datos medios que se tienen para ambos parámetros se mantienen constantes durante el período de estudio. Además, dada la poca variabilidad de las poblaciones detectadas en estas muestras, las correlaciones son meramente orientativas. Solo se han considerado los coeficientes de correlación con valor superior a 0,75 (Figura 81 anexo).

Debido a la sensibilidad del método no fue posible realizar una cuantificación de los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* y estos fueron estimados con una abundancia inferior al 1%. Por lo tanto, dado que estos resultados fueron inferiores al error del propio método de cuantificación utilizado, no tiene sentido estudiar el efecto de los distintos parámetros en la población de estas metanogénicas. Lo mismo sucede con las SRB detectadas por la sonda SRB385.

El análisis ha mostrado una correlación negativa (-0,79) entre la clase *Betaproteobacteria* y el TRC (Figura 66). No obstante, como ya se ha dicho, esta relación es meramente orientativa dada la poca variabilidad de estas bacterias y del TRC en este digestor, además de los pocos datos disponibles.

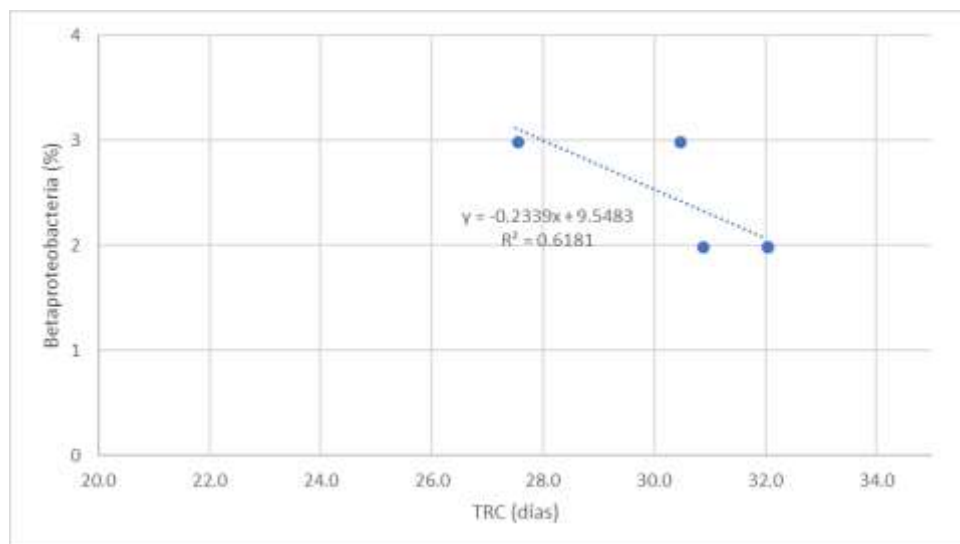


Figura 66. Correlación entre la clase *Betaproteobacteria* y el TRC.

Para el phylum *Chloroflexi* se ha visto una correlación positiva con los SSV de 0,76 (Figura 67) y con la concentración de H₂S en el biogás (0,84) y negativa con la temperatura del digestor (0,87), la relación acidez/alcalinidad (0,91), DQO (0,92) y carga de cosustrato (0,94). Estadísticamente, la población de *Chloroflexi* no presenta variabilidad, por lo que estas correlaciones no aportan mucha información.

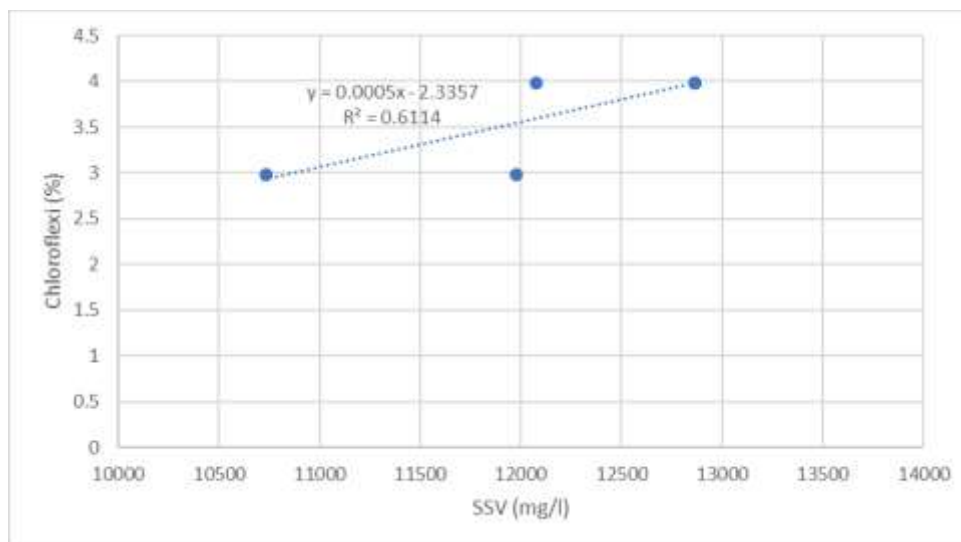


Figura 67. Correlación entre el phylum *Chloroflexi* y los SSV en el digestor.

De la misma forma, la población de *Methanosarcinales* no varía estadísticamente y la correlación negativa con la temperatura (0,92) no aporta información de importancia (Figura 68). Además, la temperatura es un parámetro que se controla, por lo que su variación no es significativa (33-30°C). También se observa una correlación negativa con el biogás (-0,73) y la relación acidez/alcalinidad (0,85). Por otro lado, presenta una correlación positiva con el TRC (0,72) y los SSV (0,72). Sin embargo, considerando que estadísticamente las metanogénicas no varían en este digestor, las correlaciones no se consideran significativas y se asume que el cosustrato no tiene un efecto significativo sobre la población de metanogénicas.

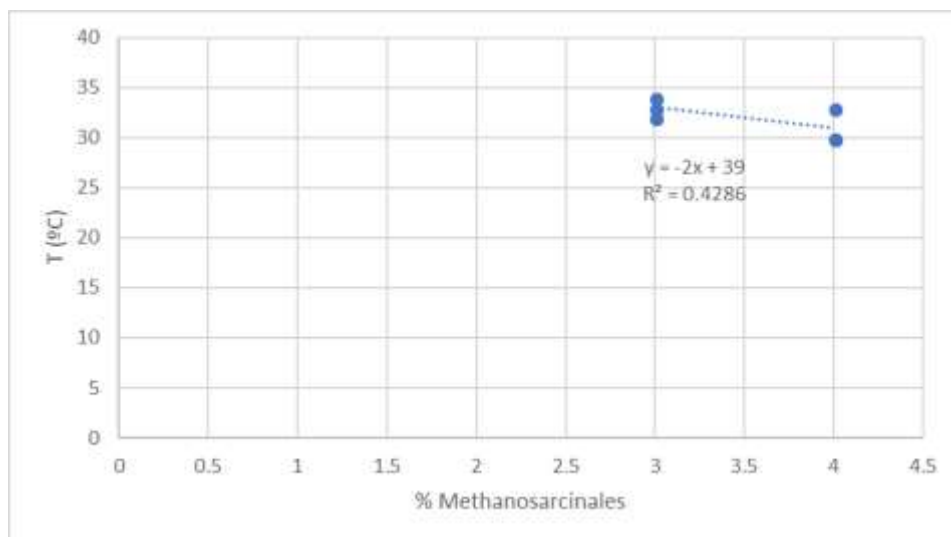


Figura 68. Correlación de la temperatura del digestor con la población de *Methanosarcinales*.

En la matriz de correlaciones de Gandía se observa una relación positiva entre la carga de cosustrato y los AGV (0,81) y la relación ac/alc (0,86), por lo que la adicción de cosustrato va ligada a una mayor concentración de AGV en este digestor. Sin embargo, no se ve relación entre la carga y el biogás porque probablemente estos AGV se estén acumulando y no están siendo consumidos por la metanogénicas.

Digestor de Ontinyent

Las SRB y las metanogénicas *Methanomicrobiales* fueron estimadas con una abundancia menor del 1% por lo que no se estudiará su relación con los parámetros operacionales y fisicoquímicos.

Para la población de *Betaproteobacteria* se ha obtenido una relación negativa de -0,7 con el pH, lo cual es coherente con el hecho de ser bacterias hidrolíticas y acetogénicas que generan ácidos, provocando una bajada del pH. Además, se ha visto una correlación negativa (-0,7) con las metanogénicas acetoclásticas en relación con lo comentado anteriormente de que ambos grupos de microorganismos consumen el mismo sustrato. Con la temperatura, según este análisis, también existe una relación positiva. Sin embargo, al representar los datos (Figura 69) no se observa una relación significativa. Lo mismo ocurre con el TRC.

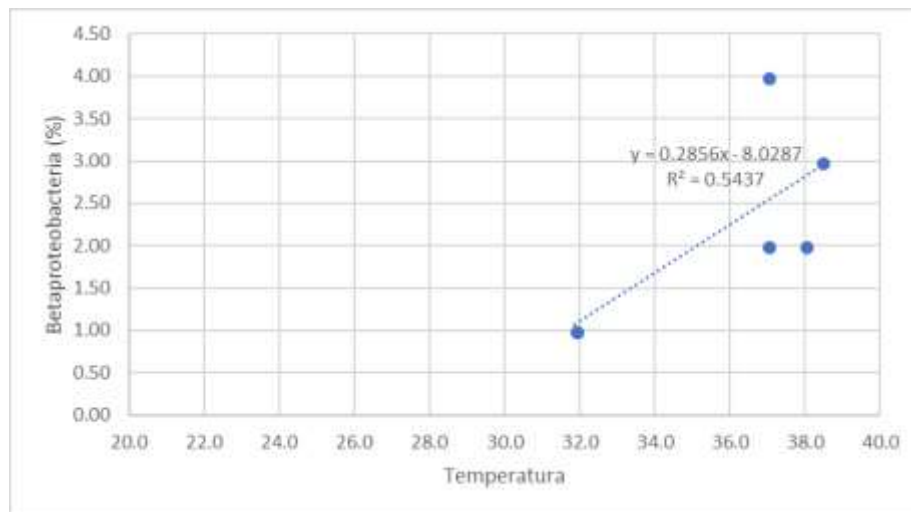


Figura 69. Correlación entre las bacterias de la clase Betaproteobacteria y la temperatura

Se ha obtenido una correlación de -0,8 entre *Betaproteobacteria* y los AGV (Figura 70). Estas bacterias generan AGV, por lo que esta relación podría indicar que en este caso los AGV aumentan por la acción de otras bacterias o porque se están acumulando en el medio.

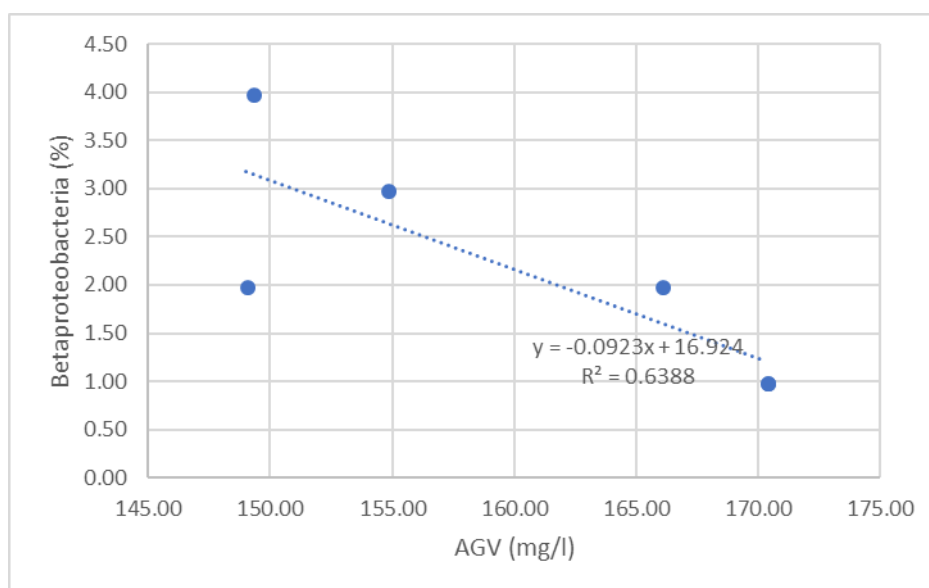


Figura 70. Correlación entre las bacterias de la clase Betaproteobacteria y los AGV.

Entre los parámetros fisicoquímicos y operacionales de este digestor se han obtenido las siguientes correlaciones:

- Correlación negativa entre la temperatura y los SSV y positiva con la producción de biogás. A mayor T existe más actividad microbiológica y una mayor estabilización del fango, por lo que es lógico que se genere más biogás como producto de la metanogénesis (Figura 71).

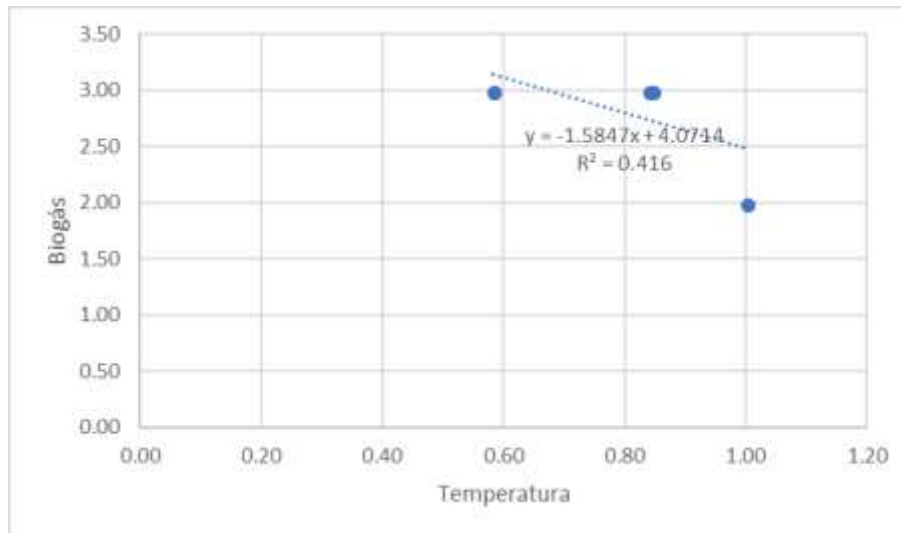


Figura 71. Correlación entre el biogás y la temperatura.

- Correlación negativa entre AGV y temperatura: La temperatura podría estar favoreciendo más la actividad de las metanogénicas que la de las bacterias que producen los AGV. En este caso, los AGV no se acumulan porque son consumidos por las metanogénicas.
- Correlación positiva AGV y TRC: TRC más elevados permiten que los materiales más lentos de hidrolizar permanezcan más tiempo en contacto con las bacterias y que estos se acaben transformando en moléculas más pequeñas y posteriormente en ácidos volátiles. Más TRC, más hidrólisis y más ácidos volátiles.
- Correlación positiva entre la carga de SSV y el biogás generado: tiene sentido ya que la volatilidad está relacionada con una mayor biodegradabilidad.
- Correlación negativa %CH₄ y AGV: a más acidez menos metano, lo cual puede ser debido a que las metanogénicas son sensibles a las bajadas de pH.
- Correlación negativa %CH₄ y SSV: una mayor estabilización del fango conlleva una concentración de SSV menor y una mayor generación de metano.
- Correlación positiva AGV y SSV: las bacterias son una parte de los SSV del digestor y eso significa que a mayor concentración de SSV habrá más bacterias encargadas de generar los AGV.
- Correlación positiva pH y ac/alc: no tiene sentido ya que al aumentar el pH disminuye la acidez y la relación acidez/alcalinidad disminuye. Ambos parámetros presentan una relación negativa y no positiva. De la misma forma, se ha obtenido una relación positiva entre el pH y los AGV, que tampoco tiene sentido y negativa entre el pH y la alcalinidad.

Las correlaciones obtenidas a partir de este análisis nos aportan una idea global de las posibles relaciones, ya que tanto los parámetros operacionales como las poblaciones de microorganismos presentan poca variabilidad.

Por último, también se realizó una matriz de correlaciones conjunta para los tres digestores para ver si existía alguna tendencia fuerte entre algunos parámetros (Figura 83 en el anexo). Se vio la relación negativa de *Chloroflexi* con el TRC (-0,65) y con la temperatura (-0,75). *Actinobacteria* mostró una correlación de -0,73 con los SSV. Estas correlaciones se obtuvieron también en la matriz de correlaciones del digestor de QB (página 89 y 91).

Se observó una correlación positiva (0,75) entre la producción de biogás y la población de *Methanosarcinales*, lo que indica que estos microorganismos son los principales responsables de la mayor producción de biogás en el digestor de QB. Además, fue obtenida una correlación negativa de 0,81 entre *Methanosarcinales* y la concentración de ácidos grasos volátiles en el digestor y de -0,70 entre AGV y biogás expresado como m³/Kg SSV eliminados, lo que pone de manifiesto la posible inhibición de estas arqueas por los AGV y como consecuencia, la disminución en la producción de biogás.

También quedó reflejada una correlación positiva entre la temperatura del digestor y la producción de biogás.

Este análisis mostró una relación positiva (0,92) entre los AGV y la población de metanogénicas hidrogenotróficas detectadas por la sonda MG1200b (*Orden Methanomicrobiales*), ya que las metanogénicas acetoclásticas son más vulnerables a estos ácidos y es cuando entran en juego las hidrogenotróficas (también se ve relación negativa entre ambas metanogénicas de -0,86). Sin embargo, esta relación no es para nada concluyente ya que estas arqueas fueron detectadas en una abundancia menor del 1%. Lo que si es cierto es que las metanogénicas hidrogenotróficas solo fueron detectadas en los digestores de Gandía y Ontinyent, en los que la concentración de AGV fue mayor en comparación con el de QB, aunque sin llegar a valores tóxicos para las metanogénicas. Además, también se obtuvo una correlación negativa entre las metanogénicas hidrogenotróficas y la producción de biogás (-0,76).

Methanosarcinales muestra una correlación negativa (-0,71) con los SSV en el digestor indicando que una mayor degradación orgánica conduce a una mayor producción de biogás (correlación positiva entre *Methanosarcinales* y biogás).

La matriz de correlaciones conjunta muestra una correlación con un coeficiente de -0,84 entre las SRB detectadas por la sonda SRB385 y el pH. Esto está de acuerdo con estudios previos en los que se vio como un pH más alto inhibió el crecimiento de SRB y la producción de H₂S (esto no está claro en nuestros digestores porque en el de QB la producción de H₂S es muy elevada). La elevada concentración de H₂S en el digestor de QB podría estar asociada a las SRB detectadas por la sonda SRB385Db.

Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,75 entre la temperatura y la producción de biogás. Existen numerosos estudios en los que se demuestra un mayor rendimiento del proceso de digestión gracias a temperaturas más elevadas ya que éstas favorecen el proceso de hidrólisis que es la etapa determinante de la velocidad en la digestión anaerobia (Ge *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2006).

Para visualizar mejor todas las relaciones existentes, se hizo otro estudio estadístico en el que se consideraron todas las variables simultáneamente. A continuación, se muestran los gráficos obtenidos del análisis de componentes principales que se realizó para cada digestor. Las variables que se encuentren cerca entre sí en el gráfico de cargas significan que están correlacionadas.

Para el digestor de QB se han seleccionado 2 componentes principales que representan un 62% de la varianza. En la figura 72 se muestra el gráfico de puntuaciones del PCA para el digestor de QB y en la figura 73 el gráfico de cargas. Éste último muestra las relaciones entre las variables e indica qué variables son responsables de los patrones observados en el gráfico de puntuaciones. Las variables que están correlacionadas positivamente están agrupadas en el mismo cuadrante mientras que las que están inversamente correlacionadas están situadas en cuadrantes opuestos diagonalmente. Puede verse como el primer componente está principalmente relacionado con la relación acidez/alcalinidad, con la población de Actinobacteria, mostrando una clara correlación positiva mientras que con la temperatura (T) muestra una fuerte correlación negativa. El segundo componente está correlacionado positivamente con la carga del cosustrato y la DQO, y de forma negativa con la concentración de H_2S en el biogás.

El gráfico de puntuaciones representa cómo las diferentes muestras se relacionan unas con otras, en términos de los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y operacionales del digestor. Las muestras de este digestor están por orden, es decir, por fechas, siendo QB1 la muestra del mes de abril-2017 y QB10 la de abril-2018. En la figura 72 puede verse como la muestra QB10 está ligeramente más alejada del resto. Según el gráfico de cargas, esto podría estar relacionado con una relación acidez/alcalinidad más elevada que en el resto de las muestras, una proporción más elevada de H_2S en el biogás y una DQO más reducida. También se podría decir que la muestra QB7 se encuentra más separada del resto, principalmente debido a que la carga de cosustrato fue más elevada en comparación con el resto de los períodos. Además, la muestra QB6 se encuentra sola en el cuadrante superior izquierdo, posiblemente relacionado con los valores más elevados de SSV, SST y DQO en el digestor en el momento en que se tomó esa muestra.

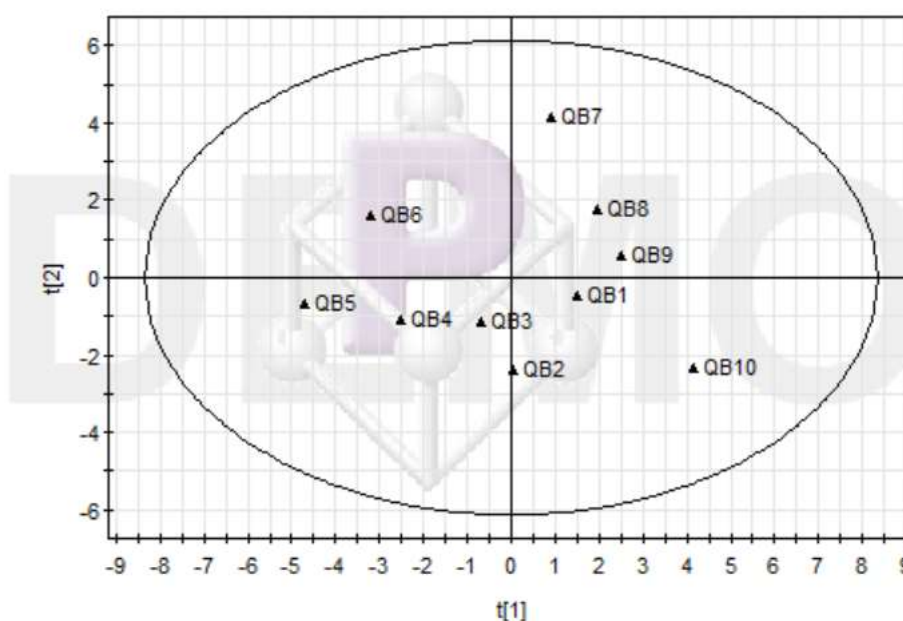


Figura 72. Gráfico de puntuaciones del PCA para el digestor de QB.

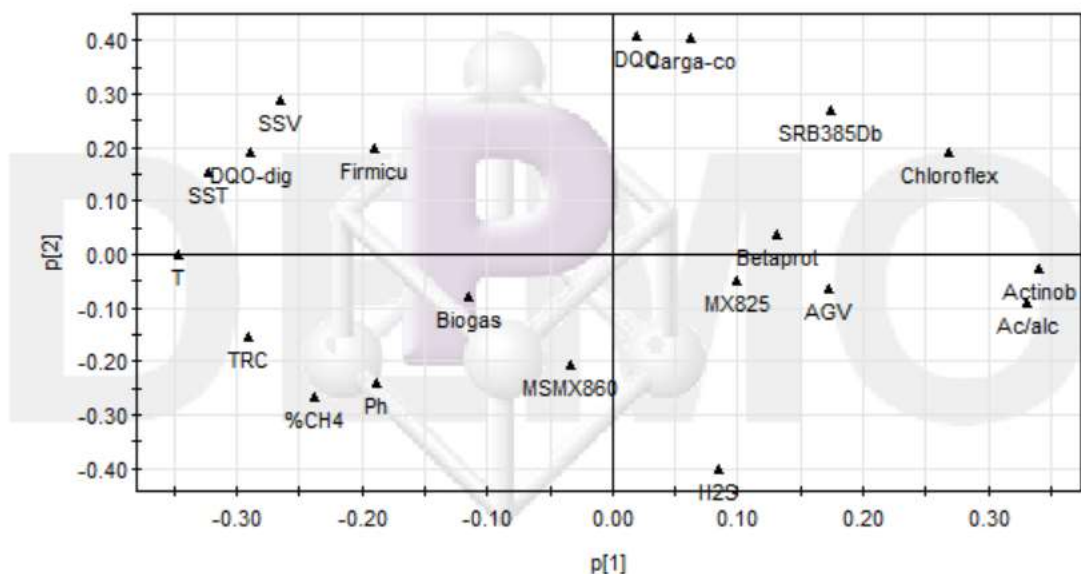


Figura 73. Gráfico de cargas del PCA para el digestor de QB.

Pueden verse las siguientes correlaciones positivas entre pares de variables: el porcentaje en metano del biogás con el pH del digestor, ya que los pH más ácidos afectan a las metanogénicas, y con el TRC, indicando que las metanogénicas se ven favorecidas por TRC más altos; los sólidos suspendidos y los totales con la DQO del digestor, ya que son parte de ésta; la población de *Betaproteobacteria* y los AGV porque los generan en su actividad; la población de *Actinobacteria* con la relación acidez/alcalinidad, asociado a que son bacterias acidogénicas.

Por otra parte, los siguientes pares presentan una correlación negativa: *Betaproteobacteria*, *Chloroflexi* y las SRB detectadas por la sonda SRB385Db con la producción de biogás y el porcentaje de metano; *Chloroflexi* con el TRC. Estas relaciones se vieron también en la matriz de correlaciones. El PCA no pone de manifiesto la correlación negativa entre *Actinobacteria* y el TRC.

El análisis de componentes principales tampoco muestra un efecto de la carga orgánica debida al cosustrato sobre las poblaciones de microorganismos.

Para el digestor de Gandía, las dos primeras componentes representan el 79% de la varianza total. La primera componente presenta una mayor correlación de forma negativa con la población de *Methanosarcinales* y positivamente con la temperatura y la relación acidez/alcalinidad. Por su parte, la segunda componente está mayormente correlacionada con la alcalinidad de forma negativa y la población de *Betaproteobacteria* de forma positiva.

Las muestras de este digestor están por orden, es decir, por fechas, siendo G1 la muestra del 8/2/18 y G6 la del 2/5/18. En la figura 74 se observa como la muestra G1 se encuentra más alejada de las demás. Las muestras G5 y G6 aparecen muy cercanas entre sí ya que para ambas se han considerado los mismos valores de los parámetros, ya que éstos fueron facilitados como valores mensuales y al ser la muestra G6 del 2-mayo se han tomado los parámetros del mes de abril por su mayor cercanía. En las muestras G3 y G4, como puede verse en las tablas 23 y 24, se detectó la misma población de bacterias con una ligera diferencia en las *Methanosarcinales*, lo que explica su cercanía en el gráfico de puntuaciones. Por su parte, para la muestra G2 se consideraron los mismos parámetros que para la G3 pero la población fue ligeramente diferente (aunque estadísticamente iguales).

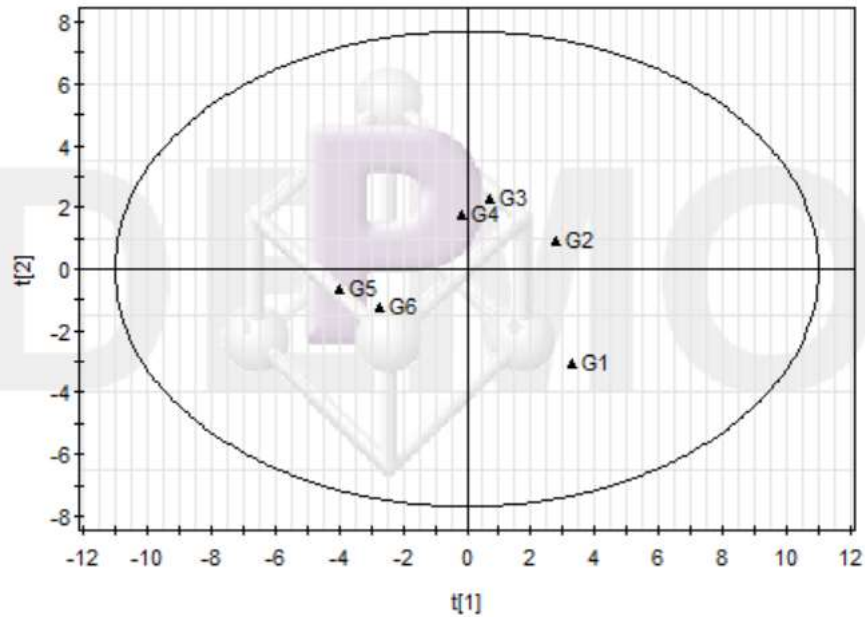


Figura 74. Gráfico de puntuaciones del PCA para el digestor de Gandía.

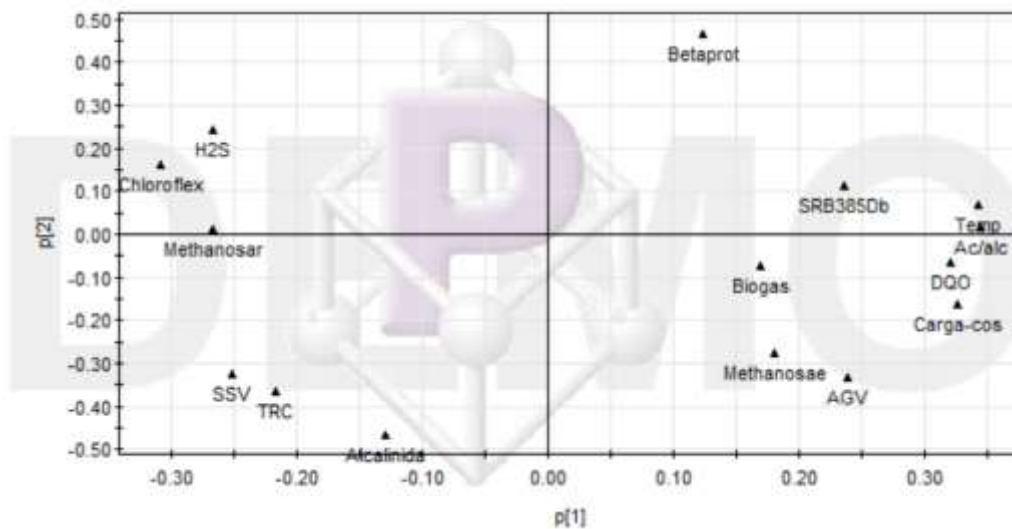


Figura 75. Gráfico de cargas del PCA para el digestor de Gandía.

En el gráfico de cargas para el digestor de Gandía (Figura 75) puede verse como los siguientes pares de variables presentan una clara correlación positiva: TRC y SSV; el género *Methanosaeta* y la concentración de AGV; la temperatura y la relación acidez/alcalinidad.

Por otra parte, los siguientes pares presentan una correlación negativa: *Chloroflexi* y carga del cosustrato; *Betaproteobacteria* y el TRC.

En el caso de Ontinyent, las dos primeras componentes representan un 82% de la varianza total. La primera componente presenta una mayor relación positiva con *Betaproteobacteria*, *Chloroflexi* y el % de CH_4 y de forma negativa con los SSV y los AGV. Por su parte, la segunda componente, está altamente correlacionada de forma positiva con la concentración de H_2S del biogás y con la alcalinidad del digestor y de forma negativa con la relación acidez/alcalinidad.

En la figura 76, se muestran las muestras de Ontinyent ordenadas por fechas, siendo On1 la de 8/2/18 y On6 la de 2/5/18. Puede verse como la muestra On1 está alejada del resto de muestras.

Esto podría estar asociado con una relación acidez/alcalinidad más elevada en comparación con el resto de los períodos. Las muestras On5 y On6 aparecen muy cercanas entre sí ya que para ambas se han considerado los mismos valores de los parámetros, ya que éstos fueron facilitados como promedios mensuales y al ser la muestra On6 del 2-mayo se han tomado los parámetros del mes de abril por su mayor cercanía. Además, la población detectada fue la misma a diferencia de las Metanogénicas acetoclásticas (Tabla 25). Con las muestras On2 y On3 sucede lo mismo que con On5 y On6. Además, su relación con On4 puede explicarse porque proceden de períodos con la misma producción de biogás y con el mismo contenido en H₂S.

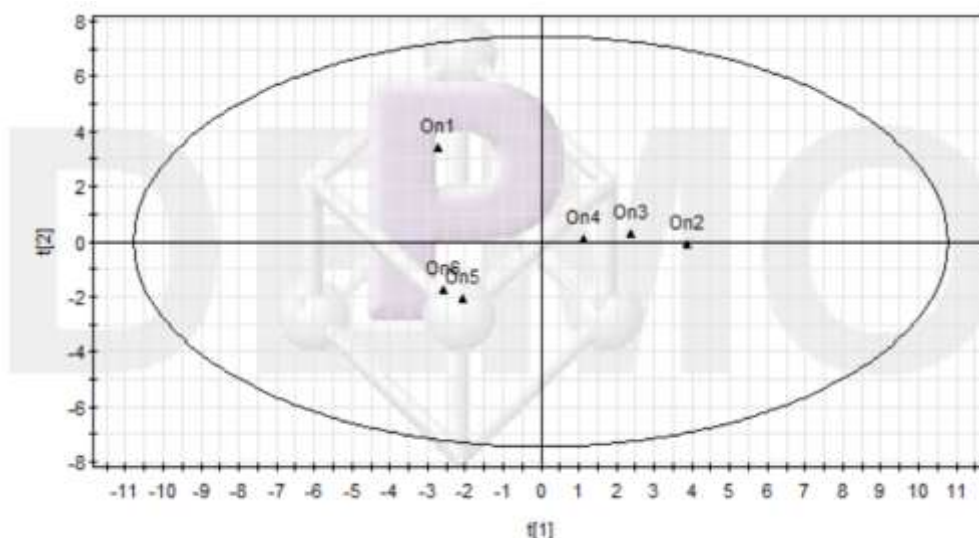


Figura 76. Gráfico de puntuaciones para el digestor de Ontinyent.

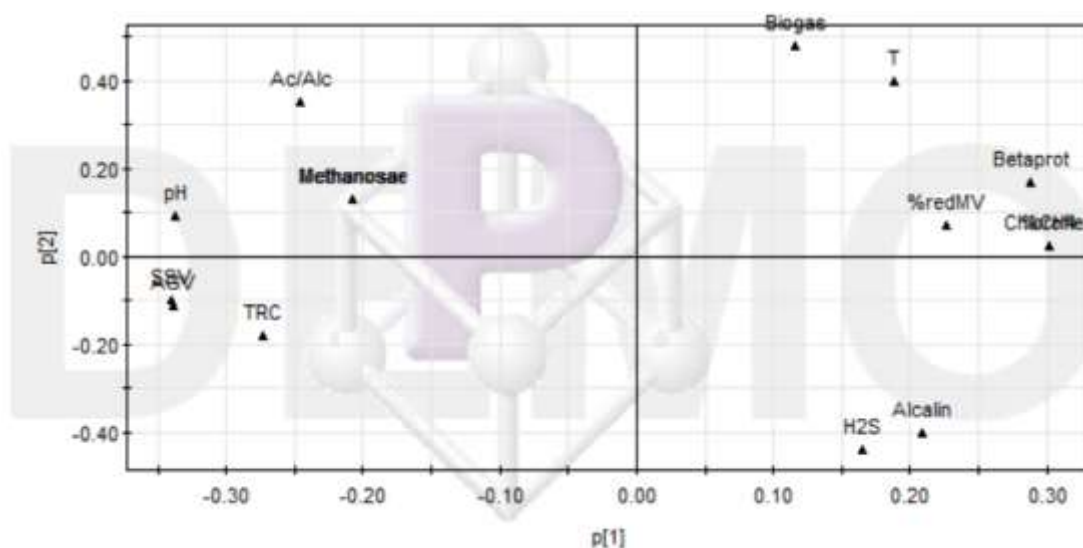


Figura 77. Gráfico de cargas digestor Ontinyent.

En el gráfico de cargas (Figura 77) se observa como las variables *Methanosaeta* y *Methanosarcinales* se encuentran superpuestas, ya que se detectó que el orden *Methanosarcinales* estaba compuesto en su totalidad por metanogénicas del género *Methanosaeta*.

También se observan las siguientes correlaciones positivas: el phylum *Chloroflexi* y la clase *Betaproteobacteria* con el porcentaje en metano del biogás aparecen superpuestas; SSV y AGV en el digestor; Alcalinidad y H₂S del biogás; las metanogénicas con la relación acidez/alcalinidad. Estas relaciones previamente se identificaron en la matriz de correlaciones. Además, se vieron

las siguientes correlaciones negativas: relación ac/alc y H_2S ; Betaproteobacteria y Chloroflexi con el TRC y con los AGV.

En la matriz de correlaciones se vio una relación de 0,94 entre la temperatura del digestor y la producción de biogás en m^3/Kg SSV eliminados. En el gráfico de cargas del PCA ambas variables aparecen cerca, por lo que también están correlacionadas según este análisis.

Para ver si existe alguna relación entre las muestras analizadas de los distintos digestores se ha realizado un PCA conjunto. En la figura 78 se muestra el gráfico de puntuaciones donde puede verse como no existe relación alguna entre las muestras de distintos digestores. Todas las muestras del digestor de Gandía se encuentran agrupadas en el cuadrante izquierdo superior, las de Ontinyent en el izquierdo inferior y las de QB entre los cuadrantes derechos. Según esto se podría decir que existe una cierta “estacionalidad” en el digestor de QB (la mitad de las muestras están en un cuadrante y la mitad en otro cuadrante).

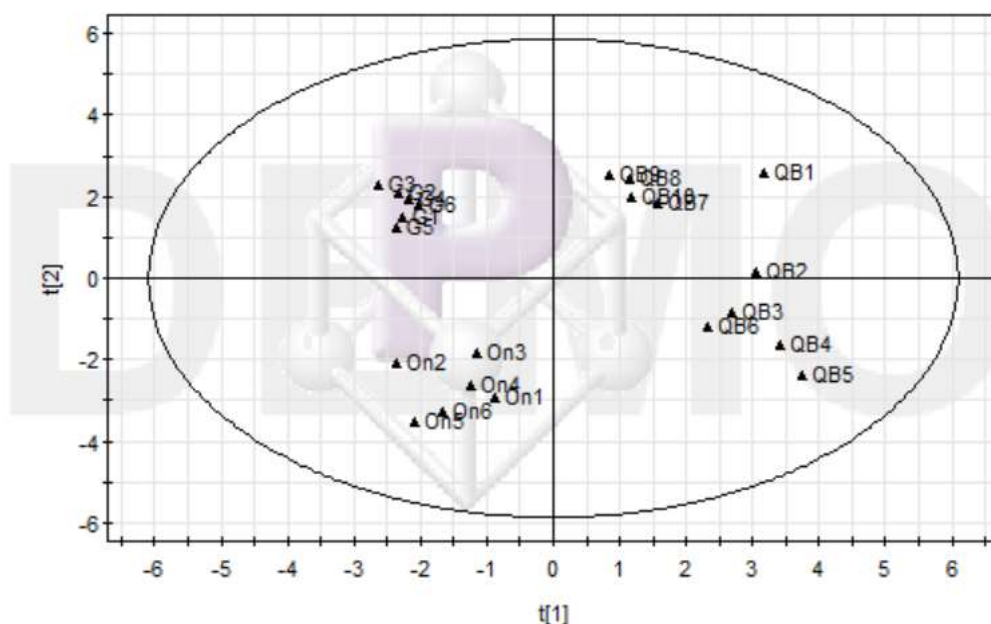


Figura 78. Gráfico de puntuaciones para todas las muestras de los tres digestores.

Se debe resaltar la fuerte correlación entre la carga de cosustrato y la población de *Methanosaeta* según el gráfico de cargas (Figura 79), por lo que la mayor abundancia de este género en el digestor de QB está relacionada con la mayor carga de cosustrato.

Según este gráfico, *Betaproteobacteria* y *Chloroflexi* presentan una relación negativa (más o menos significativa) con el pH, el TRC, la temperatura y el porcentaje en CH_4 . A su vez, estos parámetros se relacionan entre sí positivamente.

También se observa una correlación importante entre la población de *Methanosarcinales* y la producción de biogás, lo que apoya la idea de que el mayor rendimiento del digestor de QB esté relacionado con que se haya detectado un mayor porcentaje de *Methanosarcinales*.

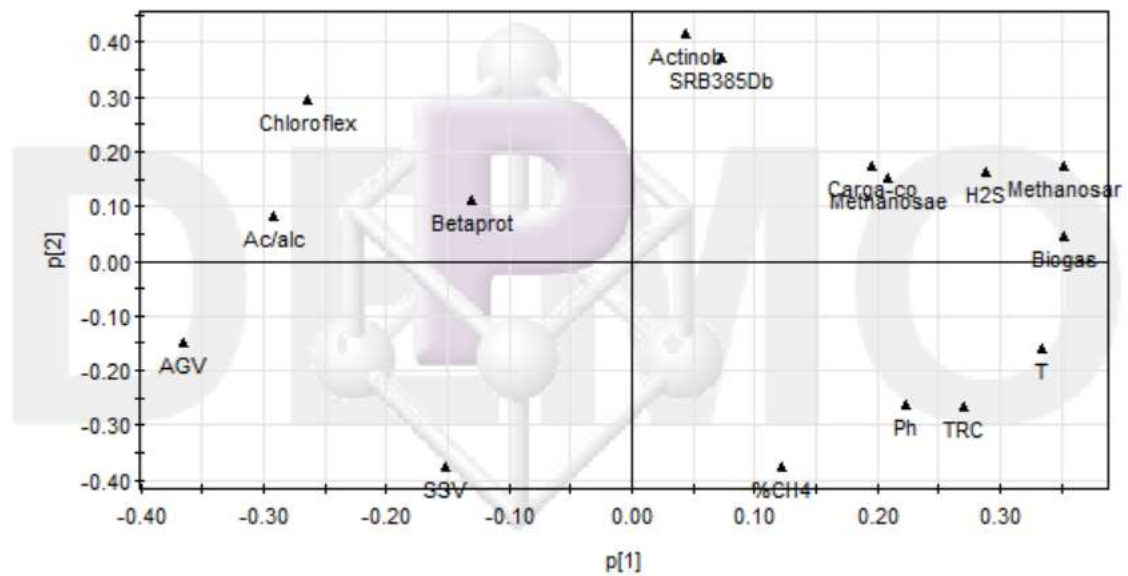


Figura 79. Gráfico de cargas para todas las muestras de los tres digestores.

Se debería esperar una correlación negativa entre el contenido en metano del biogás y la concentración de H₂S. Sin embargo, ni las matrices de correlación ni el PCA mostraron una relación significativa entre ambos parámetros.

5. Conclusiones

De los resultados de la cuantificación se puede concluir que:

- La población microbiológica presenta una dinámica más variable en el digestor de QB que en el de Gandía y Ontinyent, en los que se mantiene muy estable y prácticamente no varía.
- En los tres digestores se detectaron señales positivas para la sonda HGC69a del phylum *Actinobacteria*, las sondas del phylum *Chloroflexi* y la sonda Bet42a de la clase *Betaproteobacteria*. La sonda LGCmix que hibrida con el phylum *Firmicutes* solo mostró señal positiva en el digestor de QB, aunque con una abundancia del 1%. Esto apunta más un problema de inespecificidad de la sonda que de la no existencia de estos microorganismos. En ninguno de los digestores, la sonda CFB560 del phylum *Bacteroidetes* mostró señal positiva.
- De las distintas sondas utilizadas para la identificación de los grupos de arqueas metanogénicas, dieron resultados positivos la sonda MSX860 del orden *Methanosarcinales*, MX825 del género *Methanosaeta*, MB311 del orden *Methanobacteriales* y MG1200b de *Methanomicrobiales*. El orden *Methanosarcinales* fue el grupo de metanogénicas detectado más abundante en todas las muestras de los tres digestores, siendo el género *Methanosaeta* dominante. Las metanogénicas hidrogenotróficas del orden *Methanobacteriales* solo han sido detectadas en el digestor de Gandía y las del orden *Methanomicrobiales* en éste y en el de Ontinyent, aunque ambos fueron estimados con una abundancia menor del 1%. La sonda MC1109 del orden *Methanococcales* no dio resultados positivos.
- Las sondas SRB385Db y SRB385 que hibridan a bacterias sulfatoreductoras de la familia *Desulfobacteraceae* y del orden *Desulfovibrionales*, respectivamente, dieron resultados positivos en los tres digestores, siendo más abundantes en los digestores de QB y Gandía. La sonda Dtm230 de *Desulfotomaculum* no mostró señales positivas.

El estudio entre las abundancias de las poblaciones microbianas y los distintos parámetros operacionales, fisicoquímicos y rendimientos de biogás mostró que:

- Es difícil ver con claridad los efectos que tienen los cambios en las distintas variables sobre la población microbiológica cuando todos los parámetros varían al mismo tiempo y no se están modificando de forma independiente para estudiar su influencia.
- En general, las condiciones operacionales y ambientales tienen un efecto importante en el rendimiento de los digestores y en algunos casos en la distribución de la comunidad microbiana.
- En el digestor de QB, las bacterias de los phylum *Chloroflexi* y *Actinobacteria* parecen tener una relación negativa con el TRC que se puede asociar a que TRC elevados conducen a la estabilización del fango y, por lo tanto, a una disminución en la población de bacterias. Además, estos phylum se correlacionan negativamente con la temperatura debido a que son capaces de realizar su actividad a temperaturas más bajas que las metanogénicas. El resto de los grupos de bacterias detectados no siguen una tendencia con el TRC. Por su parte, la clase *Betaproteobacteria* presenta una

correlación negativa con la producción de biogás de este digestor. De las bacterias detectadas, el phylum *Actinobacteria* parece el más responsable de la variabilidad de AGV en el digestor.

- Tanto en el digestor de Gandía como en el de Ontinyent, estadísticamente, la población microbiológica no varía y las correlaciones obtenidas no son concluyentes. Probablemente esto esté relacionado con la baja variabilidad de los parámetros operacionales.
- La adición de cosustrato no ha mostrado efectos significativos sobre las poblaciones de bacterias y metanogénicas ni en la producción de biogás en los digestores de QB y Gandía. Seguramente sea necesario superar un cierto valor de carga orgánica para notar los efectos. No obstante, debido a los cambios de los parámetros de operación, así como la baja variabilidad de la población de *Methanosarcinales*, es posible que pasen desapercibidos ciertos efectos derivados de la adición de cosustrato debido a la dificultad de interpretar las numerosas variables que intervienen.
- La mayor variabilidad que presenta la población microbiológica en el digestor de QB posiblemente esté asociada a que se añaden más cantidad y variedad de cosustratos.
- Comparando los tres digestores, el de QB presenta una mayor producción de biogás, lo cual puede ser debido a la utilización de TRC, temperaturas y cargas orgánicas conseguidas con el aporte de cosustrato más elevadas, favoreciendo a las arqueas metanogénicas del orden *Methanosarcinales*.
- La vía acetoclástica parece ser la responsable de la producción de biogás en los digestores.
- El acetato parece exclusivamente utilizado por metanogénicas acetoclásticas en los tres digestores mientras que las SRB que utilizan H₂ predominaron sobre las metanogénicas hidrogenotróficas en la competición por el H₂ en los digestores de QB y Gandía.
- La concentración de AGV parece tener una relación con la población de arqueas detectada en cada digestor.
- En los digestores de QB y de Gandía, en los que se añaden cosustratos, la abundancia de SRB es mayor que en el de Ontinyent, en el que no se adiciona cosustrato.

La técnica FISH presenta algunos inconvenientes para la identificación de la microbiología en muestras procedentes de digestores anaerobios debido a la elevada autofluorescencia que éstas presentan. Las conclusiones obtenidas deben considerarse como recomendaciones u orientaciones para futuros estudios, pero en ningún caso se deben considerar como concluyentes. En futuros estudios se aconseja usar otras técnicas moleculares junto con FISH para superar las deficiencias que presenta esta técnica con muestras procedentes de digestores anaerobios que operan a elevados TRC, ya que un buen conocimiento de la microbiología permitirá mejorar el rendimiento de los digestores anaerobios de EDAR. Así pues, se propone la utilización de técnicas basadas en PCR y técnicas de secuenciación masiva.

REFERENCIAS

- Abendroth, C., Vilanova, C., Günther, T., Luschig, O., Porcar, M., (2015). Eubacteria and archaea communities in seven mesophile anaerobic digester plants in Germany. *Biotechnol. Biofuels* 8 (1), 87.
- Abram J.W. and Nedwell D.B. (1978). Inhibition of methanogenesis by sulfate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Arch Microbiol* 117: 89±92
- Ahring, B.K., Sandberg, M., Angelidaki, I. (1995). Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 559-565.
- Ahring, B.K., Ibrahim, A.A., and Mladenovska, Z. (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65 °C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Res.* 35(10): 2446–2452
- Amani T, Nosrati M, Sreekrishnan TR (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects—a review. *Environmental Reviews.* 18(NA):255-278
- Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1997). Co-digestion of olive oil mill wastewaters with manure, household waste or sewage sludge. *Biodegradation* 8 (4), 221–226.
- Angelidaki, I., Ahring, B.K., Deng, H., Schmidt, J.E. (2002). Anaerobic digestion of olive mill effluents together with swine manure in USAB reactors. *Water Sci. Technol.* 45 (10), 213–218.
- Herto Dwi Ariesyady, Tsukasa Ito, Satoshi Okabe (2007). Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Research.* 1554 – 1568.
- Azman S., Khadem A.F., Van Lier J.B., Zeeman G., Plugge C.M. (2015). Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 45 (23), pp. 2523-2564.
- Bashir, B.H., and Matin, A. (2004). Effect of calcium and potassium on sodium inhibition to methanogenesis in anaerobic treatment processes. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 3: 769–776.
- Beer, M.; Seviour, E.M.; Kong, Y.; Cunningham, M.; Blackall, L.L.; Seviour, R.J. (2002). Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS Microbiol. Lett.*, núm. 207, págs. 179-183.
- Björnsson, L.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W.; Blackall, L. (2002). Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*, núm.148, págs. 2.309-2.318.

- Blotevogel, K. H., Gahl-Janßen, R., Jannsen, S., Fischer, U., Pilz, F., Auling, G., & Tindall, B. J. (1991). Isolation and characterization of a novel mesophilic, fresh-water methanogen from river sediment *Methanoculleus oldenburgensis* sp. nov. *Archives of microbiology*, 157(1), 54-59.
- Bolzonella, D., Battistoni, P., Susini, C., Cecchi, F. (2006). Anaerobic co-digestion of waste activated sludge and OFMSW: the experience of Viareggio and Treviso plants (Italy). *Water Sci. Technol.* 53, 203–211.
- Borrel, G., Jezequel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.P., Peyret, P., Fonty, G. y Lehours, A.C. (2011). Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology* 162: 832-847.
- Bryukhanov, A.L. and Netrusov, A.I. (2007). Aerotolerance of Strictly Anaerobic Microorganisms and Factors of Defense against Oxidative Stress: A Review, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2007, vol. 43, no. 6, pp. 637–654 [*Appl. Biochem. Microbiol. (Engl. Transl.)*, vol. 43, no. 6, pp. 567–582].
- Buekens, A. (2005). Energy recovery from residual waste by means of anaerobic digestion technologies. *In Proceedings of the Conference “The future of residual waste management in Europe”*.
- Cabbai V., Ballico M., Aneggi E., Goi D. (2013). BMP tests of source selected OFMSW to evaluate anaerobic co-digestion with sewage sludge. *Waste Manage.*, 33 (7), pp. 1626-1632.
- Cardinali-Rezende J., Luís F.D.B. Colturato, Thiago D.B. Colturato, Edmar Chartone-Souza, Andréa M.A. Nascimento, José L. Sanz (2012). Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Bioresource Technology* 119. 373–383.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* 99 (10), 4044-4064.
- Chin, K.-J., T. Lueders, M. W. Friedrich, M. Klose, and R. Conrad. (2004). Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microb. Ecol.* 47:59–67.
- R. Chouari, D. Le Paslier, C. Dauga, P. Daegelen, J. Weissenbach, A. Sghir (2005). Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, pp. 2145-2153.
- Colleran E, Finnegan S, Lens P (1995). Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67:29–46.
- Colleran E., Pender S. (2002). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sulphate-containing wastewaters. *Water Sci. Technol.* 45 (10), 231-235.
- Collins, G., Foy, C., McHugh, S., Mahony, T., O’Flaherty, V. (2005). Anaerobic biological treatment of phenolic wastewater at 15-18°C. *Water Research* 39: 1614-1620.
- Conrad, R. (2007). Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Advances in Agronomy*. 96: 1-63.
- Conrad, R., Erkel, C., Liesack, W. (2006). Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. *Curr Opin Biotechnol* 17, 262–267.

Daly K., Sharp R. J. and McCarthy A. J. (2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology*. 146: 1693-1705.

Demirel, B., Yenigün, O. (2006). Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresource Technology* 97, 1201-8.

Demirel, B., Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 7:173–90.

De Bok, F.A.M., Plugge, C.M., and Stams, A.J.M. (2004). Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Res*. 38(6): 1368–1375

De Jonge, N., Moset, V., Møller, H.B., Nielsen, J.L. (2017). Microbial population dynamics in continuous anaerobic digester systems during start up, stable conditions and recovery after starvation. *Bioresour. Technol*. 232, 313–320.

Di Maria, F., Sordi, A., Cirulli, G., Gigliotti, G., Massaccesi, L., Cucina, M., (2014). Cotreatment of fruit and vegetable waste in sludge digesters. An analysis of the relationship among bio-methane generation, process stability and digestate phytotoxicity. *Waste Manage*. 34, 1603–1608.

Di Maria F., Martino Barratta (2015). Boosting methane generation by co-digestion of sludge with fruit and vegetable waste: Internal environment of digester and methanogenic pathway. LAR Laboratory – Dipartimento di Ingegneria, Via G. Duranti 93, 06125 Perugia, Italy.

Dolla, A., Fournier, M., and Dermoun, Z. (2006). Oxygen Defence in Sulfate-Reducing Bacteria, *J. Biotechnol.*, vol. 126, no. 1, pp. 87–100.

El-Mashad H.M., McGarvey J.A., Zhang R. (2008). Performance and microbial analysis of anaerobic digesters treating food waste and dairy manure. *Biol. Eng.*, 1, pp. 233-242.

Ferry, J.G. (2010). The chemical biology of methanogenesis. Review article. *Planetary and Space Science* 581: 775–1783.

Fey, A., and R. Conrad. (2000). Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol*. 66:4790–4797.

Fezzani, B., Ben Cheikh, R. (2007). Anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste in a tubular digester at a mesophilic temperature. *Biores. Technol*. 98, 769–774.

Fountoulakis M., Petousi I., Manios T. (2010). Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. *Waste Manage.*, 30, pp. 1849-1853.

Fukui, M., Teske, A., Ammus, B., Muyzer, G. & Widdel, F. (1999). Physiology, Phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). *Archives of Microbiology*, 172: 193-203.

Gallert, C., and Winter, J. (2008). Propionic acid accumulation and degradation during restart of a full-scale anaerobic biowaste digester. *Bioresour. Technol*. 99(1): 170–178.

Garcia, I.L. (1990). Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiology Reviews* 87: 297–308.

Garcia, J. L., B. K. C. Patel, and B. Ollivier (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe* 6:205-226.

García-Peña, E.I., Parameswaran, P., Kang, D.W., Canul-Chan, M., Krajmalnik-Brown, R. (2011). Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues: process and microbial ecology. *Bioresour. Technol.* 102, 9447-9455.

Ge, H., Jensen, P. & Batstone, D. (2011). Temperature phased anaerobic digestion increases apparent hydrolysis rate for waste activate sludge. *Water Residual*, pp. 1597-1606.

Gerardi, M.H. (2003). The Microbiology of Anaerobic Digesters. Wastewater Microbiology Series. 1ª edición. pp 51-58, 89-92.

Ghaly, A.; Ramkumar, D.; Sadaka, S.; Rochon, J. (2000). Effect of reseeded and pH control on the digester operating on acid cheese whey. *Journal Canadian Agricultural Engineering*, 42(4), 173-183.

Gomez, X., Cuestos, M.J., Cara, J., Moran, A., Garcia, A.I. (2006). Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes. Conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate. *Renew. Energ.* 31, 2017–2024.

Gough, R. H., D. Roy, and T. R. McDowell (1987). Methane generation from digestion of whey in a two-stage system. *J. Environ. Sci. Health* 5:463–483.

Guo, J., Peng, Y., Ni, B.-J., Han, X., Fan, L., Yuan, Z. (2015a). Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb. Cell Factor.* 14 (1), 33.

Hanreich A, Schimpf U, Zakrzewski M, Schlüter A, Benndorf D, Heyer R, *et al.* (2013). Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst Appl Microbiol.* 36:330–8.

Hao O.J., Chen J.M., Huang L. & Buglass R. 1. (1996). Sulfate reducing bacteria. Reviews in Environmental Science and Technology, 26, 155-187.

Hernández, H. (2005). Tratamiento de lactosuero hidrolizado por medio de un reactor UASB. Pregrado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo.

Hu M, Wang X, Wen X *et al.* (2012) Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresour Technol* 117:72–79

Huber, R. & Stetter K. O. (2001). Order I. *Methanopyrales* ord. nov. In: Boone, D. R., Castenholz, R. W., & Garrity, G. M. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. 2nd ed. Springer Verlag. New York

Isa, Z., Grusenmeyer, S. & Verstraete, W. (1986). Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic-digestion. *Appl. Environ. Microbiol*, pp. 580-587.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 929–936.

Jarvis, G. N., Strömpl, C., Burgess, D. M., Skillman, L. C., Moore, E. R., & Joblin, K. N. (2000). Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current microbiology*, 40(5), 327-332.

Jenkins, D.; Richard, M.; Daigger, G. (2004). Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming. 3th Ed. Lewis publishers. Nueva York, EEUU.

Jo, G.H.; Jung, W.J.; Kuk, J.H.; Oh K.T.; Kim, Y.J. and Park, R.D. (2008). Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. *Carbohydrate Polymers*, vol. 74, no. 3, p. 504-508.

K.F. Brisolara, Y. Qi (2011). Biosolids and sludge management. *Water Environ. Res.*, 83 (10), pp. 1351-1375.

Karakashev D, Batstone DJ, Angelidaki I (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl Environ Microbiol* 71(1):331–338.

D. Karakashev, D.J. Batstone, E. Trably, I. Angelidaki (2006). Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (7), pp. 5138-5141.

Khalid A, Arshad M, Anjum M, Mahmood T, Dawson L (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*. 31(8):1737-1744.

T. Kindaichi, T. Ito, S. Okabe (2004). Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microb.*, 70 (3), pp. 1641-1650.

Kragelund, C.; Levantesi, C.; Borger, A. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.*, núm. 59, págs. 671-682.

Kragelund, C.; Thomsen, T.R.; Mielczarek, A.T.; Nielsen, P.H. (2011). Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, núm. 76, págs. 451-462.

Kristjansson, J. K., P. Schonheit, and R. K. Thauer. (1982). Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch. Microbiol.* 131:278-282.

Ke, S., and Z. Shi. (2005). Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment. *Int. J. Environ. Pollut.* 23:65–80

Ken F. Jarrell and Martin L. Kalmokoff, (1987). Nutritional requirements of the methanogenic archaeobacteria. *Department of Microbiology and Immunology, Queen's University, Kingston, Ont., Canada K7L 3N6*. CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY. VOL. 34.

Kim, J. y otros (2006). Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. *Biosci. Bioeng.*, pp. 328-332.

Koster, I. W., and G. Lettinga (1984). The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agric. Waste* 9:205-216.

Lee, S.H., Kang, H.J., Lee, Y.H., Lee, T.J., Han, K., Choi, Y., Park, H.-D. (2012b). Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full scale anaerobic digesters. *J. Environ. Monit.* 14 (7), 1893–1905.

Lee, J. y otros (2014). Temporal variation in methanogen communities of four different full-scale anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater. *Bioresource Technology*, pp. 59-63.

Lens PNL & Kuenen JG (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Wat. Sci. Tech.* 44(8): 57–66

L. Leven, A.R.B. Eriksson, A. Schnurer (2007). Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, pp. 683-693.

Li Y, Park SY, Zhu J (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 15(1):821-826

Lorenzo Acosta, Yaniris, Obaya Abreu, Ma Cristina, La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea] 2005, XXXIX (Sin mes): [Fecha de consulta: 15 de julio de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659006>> ISSN 0138-6204.

Lü F., Hao L., Zhu M., Shao L., He P. (2012). Initiating methanogenesis of vegetable waste at low inoculum-to-substrate ratio: Importance of spatial separation. *Bioresource Technology*, 105 (0), pp. 169-173.

Maragkaki A.E., Vasileiadis I., Fountoulakis M., Kyriakou A., Lasaridi K., Manios T. (2018). Improving biogas production from anaerobic co-digestion of sewage sludge with a thermal dried mixture of food waste, cheese whey and olive mill wastewater. *Waste Management*. Volumen 71, pages 644-651.

McMahon, K. D., P. G. Stroot, R. I. Mackie, and L. Raskin. (2001). Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions. II. Microbial population dynamics. *Water Res.* 35:1817–1827.

Moñino, P., Jiménez, E., Barat, R., Aguado, D., Seco, A., Ferrer, J., (2016). Potential use of the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic co-digestion with wastewater in submerged anaerobic membrane technology. *Waste Manage.* 56, 158–165.

Moon, C. y otros (2015). Effect of COD:SO₄²⁻ Ratio, HRT and Linoleic Acid Concentration on Mesophilic Sulfate Reduction: Reactor Performance and Microbial Population Dynamics. *Water*, pp. 2275-2292.

Montalvo Martínez, Silvio J. (2000). Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Generalidades. (Monografía). p.p 1-36.

Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Peeva, L. and Livingston, A. (2000). Microbial sulfate reduction in a liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 70, 370.

Nakakihara E, Ikemoto-Yamamoto R, Honda R, Ohtsuki S, Takano M, Suetsugu Y, *et al.* (2014). Effect of the addition of rice straw on microbial community in a sewage sludge digester. *Water Sci Technol.* 70:819–27.

Nelson, M.C., Morrison, M., Yu, Z. (2011). A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresour. Technol.* 102 (4), 3730–3739.

Nguyen HTT, Le VQ, Hansen AA *et al.* (2011). High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Ecol* 76:256–267.

Nielfa A., Cano R., Fdz-Polanco M. (2015). Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge *Biotechnol. Reports*, 5, pp. 14-21.

Nielsen P. H., Daims H., Lemmer H. (2009). FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH.

Nielsen PH, Mielczarek AT, Kragelund C *et al.* (2010) A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Res* 44:5070–5088

Nosrati, M., Shojaosadati, S.A., Sreekrishnan, T.R., and Mukhopadhyay, S.N. (2004). Inhibition of thermophilic anaerobic digestion of waste food by long chain fatty acids and propionate. *Iran. J. Biotechnol.* 2: 261–268.

Ollivier, B. M., Mah, R. A., Garcia, J. L., & Robinson, R. (1985). Isolation and Characterization of *Methanogenium aggregans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(2), 127-130.

Patidar, S.K., Tare, V (2005). Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. *Bioresource Technology*, v.96, p. 1215-1222.

Patil, S.S., Kumar, M.S., Ball, A.S. (2011). Microbial community dynamics in an anaerobic bioreactors and algal tanks treating piggery wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 353-363.

Pitk P., Kaparaju P., Palatsi J., Affes R., Vilu R. (2013). Co-digestion of sewage sludge and sterilized solid slaughterhouse waste: Methane production efficiency and process limitations. *Biores. Technol.*, 134, pp. 227-232.

Potts LG, Martin DJ (2009). Anaerobic digestion, gasification, and pyrolysis. in *Encyclopedia of Life Support Systems: Waste Management and Minimization*. 17:194-294

Rajagopal, R., Masse, D.I., Singh, G. (2013). A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresour. Technol.* 143, 632–641.

Ramakrishna, D.M., Viraraghavan, T. (2005). Strategies for sludge minimization in activated sludge process - A review. *Fresenius Environmental Bulletin*, 14(1), 2-12.

Ramón Zornoza Martínez (2015). Estudio de las poblaciones de arqueas metanogénicas y bacterias acidogénicas degradadoras de celulosa en un sistema anaerobio para el tratamiento

de agua residual y fracción orgánica de RSU mediante FISH (TFM). Universidad Politécnica de Valencia.

Rincón *et al.* (2008). Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue. *Biochemical Engineering Journal* 40 (2008) 253-261.

Rivard, C. J., Henson, J. M., Thomas, M. V., & Smith, P. H. (1983). Isolation and characterization of *Methanomicrobium paynteri* sp. nov., a mesophilic methanogen isolated from marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 46(2), 484-490.

Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.* 3 (6), 700–714.

Rong Xua, Kai Zhanga, Pu Liub, Aman Khana, Jian Xiongca, Fake Tianc, Xiangkai Lia (2018). A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology*. Volume 247, Pages 1119-1127

Saddoud A., Hassaïri I., Sayadi S. (2007). Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour. Technol.*, pp. 2102-2108

Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. and Kamagata, Y. (2008). *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 929–936.

Schink B. and Zeikus J.G. (1980) Microbial methanol formation: a major end product of protein metabolism. *Curr Microbiol* 4: 387±389

Schink, B. (2008). Principles of Anaerobic Degradation of Organic Compounds Biotechnology (pp. 169-192): Wiley-VCH Verlag GmbH.

Schonheit, P., J. K. Kristjansson, and R. K. Thauer (1982). Kinetic mechanism for the ability of sulfate reducers to outcompete methanogens for acetate. *Arch. Microbiol.* 132: 285-288.

Schuchmann, K., Müller, V., (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (12), 809–821.

Seco A., Ferrer J. (2003). Tratamientos biológicos de aguas residuales. Universidad Politécnica de Valencia.

Seeliger S, Janssen PH, Schink B (2002). Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol Lett* 211:65–70

Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 1280–1288.

S. Semblante, F.I. Hai, W.S. Guo, H.H. Ngo, S.-J. You, W. Price, D.L. Nghiem (2014). Sludge cycling between aerobic, anoxic and anaerobic regimes to reduce sludge production during wastewater treatment: performance, mechanisms, and implications. *Biores. Technol.*, 155, pp. 395-409

Shigehisa, I., and Takane, K. (1994). Wastewater treatment with microbial films.

Shin S.G., Han G., Lim J., Lee C., Hwang S. (2010). A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater. *Water Res.*, 44 (17), pp. 4838-4849

Shuizhou Ke and Zhou Shi (2005). Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment. *Int. J. Environment and Pollution*, Vol. 23, No. 1.

Smith, K.S. & Ingram-Smith, C. (2007). *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *TRENDS in Microbiology*, 15(4), 150-155

Speirs, L.; Nittami, T.; McIlroy, S.; Schroeder, S.; Seviour, R.J. (2009). Filamentous Bacterium Eikelboom Type 0092 in Activated Sludge Plants in Australia is a Member of the Phylum Chloroflexi. *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 8, págs. 2.446-2.452.

Staley, J. T., M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Stams AJ (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:271–294

Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H., Sorensen, S.J., Karlsson, A. (2013). 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85 (3), 612–626.

Van Kuijk, B.L.M., Schlotter, E., and Stams, A.J.M. (1998). Investigation of the fumarate metabolism of the syntrophic propionateoxidizing bacterium strain MPOB. *Arch. Microbiol.* 169(4): 346–352.

Visser A. (1995). *The anaerobic treatment of sulphate-containing wastewater. Ph. D. thesis.* University of Wageningen, Wageningen, The Netherlands

Vrieze J., Hennebel T., Boon N., Verstraete W. (2012). Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology*, 112 (0).

Wan CY, De Wever H, Diels L *et al.* (2011) Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Res* 45:1129–1138.

Wang X, Hu M, Xia Y *et al.* (2012). Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Bioresour Technol* 78(19):7042–7047.

Wang M., Sahu A.K., Rusten B., Park C. (2013). Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Biores. Technol.*, 142, pp. 585-590.

Weber, S., T. Lueders, M. W. Friedrich, and R. Conrad (2001). Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38:11–20.

Whitman, W. B., Boone, D. R., Koga, Y. & Keswani, J. (2001). Taxonomy of methanogenic *Archaea*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, pp. 211–213. Edited by Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M. New York.: Springer.

Widdel F. (1988). Microbiology and ecology of sulphate- and sulfur-reducing bacteria. In *Biology of anaerobic microorganisms* (Edited by Zehnder A. J. B.), pp. 469–586. Wiley, New York

Winfrey M.R. and Zeikus J.G. (1977). Effect of sulfate on carbón and electron flow during microbial methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 33 no. 2. 275-281.

Wirth, R., Kovacs, E., Maroti, G., Bagi, Z., Rakhely, G., Kovacs, K. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* 5 (1), 41.

Xiaohu Dai, Chongliang Hu, Dong Zhang, Lingling Dai, Nina Duan (2017). Impact of a high ammonia-ammonium-pH system on methane-producing archaea and sulfate-reducing bacteria in mesophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, Volume 245, Part A, Pages 598-605

Xie, M., Nghiem, L.D., Price, W.E., Elimelech, M. (2013). A forward osmosis membrane distillation hybrid process for direct sewer mining: system performance and limitations. *Environ. Sci. Technol.* 47 (23).

Xu, F., Li, Y. (2012). Solid-state co-digestion of expired dog food and corn stover for methane production. *Bioresour. Technol.* 118, 219e226

Yang, K., Y. Yu, and S. Hwang (2003). Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese whey wastewater to acetic and butyric acids: Partial acidification and methanation. *Water Res.* 37:2467–2477.

Yamrot M. Amha, Muhammad Zohaib Anwar, Andrew Brower, Carsten S.Jacobsen, Lauren B. Stadle, Tara M. Webster, Adam L. Smith (2018). Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. *Bioresource Technology* Volume 247, Pages 999-1014

Zamanzadeh, M., Parker, W., Verastegui, Y. & Neufeld, J. (2013). Biokinetic and molecular studies of methanogens in phased anaerobic digestion systems. *Bioresource Technology*, pp. 318-326.

Zayed, G. and Winter, J. (2000). Inhibition of methane production from whey by heavy metals—protective effect of sulfide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53(6): 726–731.

Zheng D., Raskin L. (2000) Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. *Microb Ecol* 39(3):246–262.

Zinder, S. H., Anguish, T., & Lobo, A. L. (1987). Isolation and characterization of a thermophilic acetotrophic strain of *Methanothrix*. *Archives of microbiology*, 146(4), 315-322.

Zinder, S. H., Sowers, K. R., & Ferry, J. G. (1985). Notes: *Methanosarcina thermophila* sp. nov., a thermophilic, acetotrophic, methane-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(4), 522-523.

Zinder, S. H. 1993. Physiological ecology of methanogens, p. 128–206. *In* J. G. Ferry (ed.), *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry and genetics*. Chapman & Hall, New York, N.Y.

ANEXO

	SRB385Db	Betaproteobac	Firmicutes	Actinobacteria	Chloroflexi	Methanosarcinal	Methanosaeta	TRC	Biogás	% CH4	T	Carga cosust	DQO cosust	Ph	SSV	SST	AGV	Ac/Alc	DQO digestor
SRB385Db	1.00																		
Betaproteobacteria	0.08	1.00																	
Firmicutes	0.26	-0.43	1.00																
Actinobacteria	0.53	0.10	-0.44	1.00															
Chloroflexi	0.50	0.12	0.03	0.77	1.00														
Methanosarcinales	-0.37	0.11	-0.25	0.02	-0.07	1.00													
Methanosaeta	0.33	-0.56	0.09	0.55	0.50	0.34	1.00												
TRC	-0.57	-0.23	0.39	-0.85	-0.82	-0.17	-0.53	1.00											
Biogás	0.01	-0.86	0.43	-0.07	-0.16	-0.04	0.45	0.26	1.00										
% CH4	-0.67	-0.15	0.01	-0.60	-0.65	0.63	0.02	0.52	0.13	1.00									
T	-0.46	-0.55	0.43	-0.86	-0.72	-0.01	-0.18	0.81	0.51	0.54	1.00								
Carga cosustrato	0.26	0.03	0.15	0.11	0.39	-0.26	-0.04	-0.42	-0.09	-0.53	-0.13	1.00							
DQO cosustrato	0.25	0.03	0.17	0.08	0.37	-0.26	-0.06	-0.40	-0.08	-0.52	-0.10	1.00	1.00						
Ph	-0.39	-0.57	0.42	-0.32	-0.27	0.46	0.34	0.47	0.54	0.57	0.58	-0.49	-0.49	1.00					
SSV	-0.11	-0.14	0.52	-0.71	-0.36	0.01	-0.19	0.32	0.02	0.25	0.68	0.37	0.39	0.07	1.00				
SST	-0.32	-0.24	0.39	-0.84	-0.62	0.08	-0.27	0.53	0.16	0.48	0.83	0.11	0.14	0.23	0.91	1.00			
AGV	0.13	-0.28	-0.22	0.59	0.17	-0.08	0.35	-0.34	0.48	-0.42	-0.27	0.20	0.19	-0.13	-0.42	-0.46	1.00		
Ac/Alc	0.18	0.29	-0.67	0.88	0.51	0.00	0.24	-0.69	-0.31	-0.54	-0.84	0.09	0.06	-0.41	-0.72	-0.83	0.58	1.00	
DQO digestor	-0.09	-0.40	0.48	-0.68	-0.44	0.07	-0.06	0.38	0.41	0.36	0.78	0.19	0.22	0.26	0.84	0.93	-0.27	-0.82	1.00

Figura 80. Matriz de correlaciones del digestor de QB.

	SRB385Db	Betaproteobac	Chloroflexi	Methanosar	Methanosaeta	TRC	Biogás	T	SSV	AGV	Ac/Alc	DQO cosust	Carga cosust	H ₂ S
SRB385Db	1.00													
Betaproteobacteria	0.41	1.00												
Chloroflexi	-0.41	-0.17	1.00											
Methanosarcinales	-0.61	-0.67	0.67	1.00										
Methanosaeta	0.61	-0.17	-0.67	-0.17	1.00									
TRC	-0.44	-0.79	0.69	0.72	-0.33	1.00								
Biogás	0.45	0.27	-0.21	-0.73	-0.16	-0.06	1.00							
T	0.56	0.36	-0.87	-0.92	0.41	-0.63	0.66	1.00						
SSV	-0.60	-0.70	0.76	0.72	-0.52	0.97	-0.08	-0.68	1.00					
AGV	0.26	-0.39	-0.67	-0.43	0.46	0.02	0.53	0.72	-0.09	1.00				
Ac/Alc	0.52	0.23	-0.91	-0.85	0.49	-0.58	0.59	0.99	-0.65	0.79	1.00			
DQO cosustrato	0.51	-0.12	-0.92	-0.49	0.85	-0.42	0.18	0.77	-0.57	0.80	0.84	1.00		
Carga cosustrato	0.45	-0.11	-0.94	-0.51	0.50	-0.44	0.20	0.79	-0.55	0.81	0.86	0.99	1.00	
H ₂ S	-0.22	0.36	0.84	0.36	-0.66	0.19	-0.22	-0.70	0.30	-0.92	-0.80	-0.93	-0.94	1.00

Figura 81. Matriz de correlaciones del digestor de Gandía.

	Betaprot	Chloroflexi	Methanosar	Methanosaeta	T	TRC	Biogas	%CH4	H ₂ S	AGV	SSV	pH	CargaSSV	Ac/Alc
Betaproteo	1.00													
Chloroflexi	0.55	1.00												
Methanosar	-0.70	-0.32	1.00											
Methanosaeta	-0.70	-0.32	1.00	1.00										
T	0.74	0.34	-0.12	-0.12	1.00									
TRC	-0.50	-0.95	0.22	0.22	-0.52	1.00								
Biogas	0.40	0.27	0.03	0.03	0.94	-0.53	1.00							
%CH4	0.55	1.00	-0.32	-0.32	0.34	-0.95	0.27	1.00						
H ₂ S	0.07	0.32	-0.40	-0.40	-0.37	-0.01	-0.64	0.32	1.00					
AGV	-0.80	-0.83	0.39	0.39	-0.71	0.81	-0.52	-0.83	-0.29	1.00				
SSV	-0.77	-0.89	0.39	0.39	-0.65	0.87	-0.49	-0.89	-0.30	0.99	1.00			
pH	-0.67	-0.76	0.49	0.49	-0.42	0.62	-0.15	-0.76	-0.65	0.92	0.90	1.00		
CargaSSV	0.80	0.65	-0.21	-0.21	0.93	-0.79	0.87	0.65	-0.21	-0.40	-0.86	-0.61	1.00	
Ac/Alc	-0.29	-0.55	0.46	0.46	0.13	0.27	0.42	-0.55	-0.96	0.55	0.56	0.84	-0.08	1.00

Figura 82. Matriz de correlaciones del digestor de Ontinyent.

	SRB385Db	SRB385	Betaproteo	Firmicutes	Actinobacteria	Chloroflexi	Methanosarci	Methanosaeta	Methanomicro	Methanobact	TRC	Biogás	T	SSV	AGV	Ph	Carga cosus	%CH4	H ₂ S
SRB385Db	1.00																		
SRB385	-0.01	1.00																	
Betaproteob	0.05	0.33	1.00																
Firmicutes	0.61	-0.39	-0.22	1.00															
Actinobacteria	0.63	0.31	0.05	0.22	1.00														
Chloroflexi	0.31	0.56	0.24	-0.40	0.56	1.00													
Methanosarci	0.46	-0.15	-0.25	0.82	0.44	-0.25	1.00												
Methanosaeta	0.49	-0.07	-0.51	0.49	0.57	0.07	0.75	1.00											
Methanomicro	-0.58	0.40	0.16	-0.97	-0.31	0.42	-0.86	-0.49	1.00										
Methanobact	-0.10	0.30	0.32	-0.38	0.15	0.33	-0.28	-0.11	0.40	1.00									
TRC	-0.02	-0.26	-0.11	0.55	-0.36	-0.65	0.32	-0.16	-0.50	-0.30	1.00								
Biogás	0.45	-0.27	-0.23	0.79	0.18	-0.37	0.75	0.52	-0.76	-0.26	0.38	1.00							
T	0.11	-0.51	-0.12	0.70	-0.38	-0.75	0.39	0.17	-0.65	-0.35	0.64	0.75	1.00						
SSV	-0.51	-0.40	-0.11	-0.48	-0.73	-0.18	-0.71	-0.46	0.54	-0.26	-0.01	-0.44	-0.01	1.00					
AGV	-0.52	0.37	0.09	-0.90	-0.22	0.40	-0.81	-0.41	0.92	0.23	-0.40	-0.70	-0.65	0.56	1.00				
Ph	0.09	-0.84	-0.46	0.62	-0.21	-0.65	0.38	0.30	-0.61	-0.58	0.50	0.44	0.62	0.20	-0.49	1.00			
Carga cosust	0.50	-0.14	-0.04	0.57	0.29	0.04	0.42	0.26	-0.55	-0.12	0.01	0.38	0.27	-0.26	-0.48	0.18	1.00		
%CH4	-0.47	-0.62	-0.08	0.06	-0.68	-0.67	-0.07	-0.10	-0.06	-0.42	0.35	0.15	0.55	0.54	-0.07	0.58	-0.32	1.00	
H ₂ S	0.18	-0.05	-0.12	0.55	0.47	-0.28	0.67	0.37	-0.64	-0.13	0.38	0.57	0.25	-0.71	-0.52	0.26	0.11	-0.06	1.00

Figura 83. Matriz de correlaciones conjunta.

Tabla 33. Actividades de las empresas de las que proceden los cosustratos utilizados en el digestor de QB y la naturaleza de éstos.

Actividad	Residuo
Fabricación de zumos	Procesados de productos alimentarios. Lo evaporan y se concentra y por eso presenta una elevada DQO (melaza)
Pastelería y bollería	
Elaboración y embotellado de vinos	Residuos de lavados, limpieza y reducción mecánica de materias primas
Fabricación de biodiesel	
Gestión integral de residuos industriales	
Elaboración de patatas fritas	
Producción de bebidas no alcohólicas	Residuos de la producción de bebidas no alcohólicas
Envasado de miel y de otros productos elaborados	Aguas de limpieza de instalaciones de miel y bidones contenedores
Fabricación de caramelos de goma	Agua residual azucarada
Elaboración de productos alimenticios	Pasta de maíz
Fabricación y distribución de bebidas refrescantes	Mezcla de bebidas refrescantes
Elaboración de vinos especiales	Agua industrial
Apicultura	
Empresa de transformación agraria	Lodos de lavado y limpieza
Elaboración de zumos de frutas y hortalizas	

